



Université de Sherbrooke

**Implication de la signalisation SHP-2 ERK/MAPK dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium colique**

Par

Ariane Langlois

Programme de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et sciences de la santé en vue de l'obtention du grade  
maître ès science (M. Sc.) en Biologie Cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada,

Mai 2017

Membres du jury d'évaluation

Pre Nathalie Rivard, programme de Biologie Cellulaire

Pre Caroline Saucier, programme de Biologie Cellulaire

Pr Richard Blouin, programme de Biologie

© Ariane Langlois, 2017

## RÉSUMÉ

### **Implication de la signalisation SHP-2 ERK/MAPK dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium colique**

Par

Ariane Langlois

Programme de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès science (M.Sc.) en Biologie Cellulaire, Faculté de médecine et sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

La protéine tyrosine phosphatase SHP-2 est connue pour jouer un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de plusieurs tissus et organes par ses effets régulateurs sur plusieurs voies de signalisation intracellulaire. Notre laboratoire a récemment démontré que la délétion embryonnaire de SHP-2 (SHP-2<sup>CEI-KO</sup>) à l'épithélium intestinal entraîne le développement rapide d'une inflammation colique sévère. La délétion ayant lieu au stade embryonnaire, une altération dans le développement intestinal pourrait être en cause dans l'initiation de cette inflammation. Afin d'éliminer cette possibilité, un modèle de délétion conditionnelle inductible de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales (SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>) a été généré, la délétion ayant été induite par injection de tamoxifène trois mois après la naissance. Ce modèle a permis d'éliminer la composante développementale, la délétion ayant lieu chez la souris adulte. De manière intéressante, les souris subissant la délétion de SHP-2 développent aussi une inflammation colique suite à 18 jours de traitement au tamoxifène. Cette inflammation s'accompagne d'une diminution de l'activité de la signalisation MEK/ERK MAPK et d'une activation de la signalisation JAK/STAT. Des altérations dans la différenciation des cellules caliciformes et de Paneth sont observées, les souris expérimentales présentant une diminution du nombre de cellules caliciformes ainsi qu'une présence aberrante de cellules intermédiaires (précurseurs des cellules caliciformes) dans leur côlon. Cette diminution du nombre de cellules caliciformes est présente dès le 10<sup>e</sup> jour de traitement au tamoxifène, précédant donc l'apparition des signes d'inflammation colique, ceux-ci débutant seulement au 12<sup>e</sup> jour de traitement au tamoxifène. Nos résultats sur une lignée cellulaire capable de se différencier dans un phénotype caliciforme, les LS174T, montrent une activation de la voie Notch suite à l'inactivation de la voie ERK/MAPK, cette activation étant associée à une augmentation de l'expression des gènes associés aux cellules caliciformes. Ces résultats corréleront avec l'observation que MEK/ERK est inhibée dans l'épithélium déficient pour l'expression de SHP-2 alors que celle de Notch est activée. Ces résultats nous indiquent donc un rôle important de la tyrosine phosphatase SHP-2 dans le maintien de l'homéostasie intestinale, et ce, même chez l'adulte. L'inactivation de SHP-2 résulte en effet dans la perte de l'intégrité de la muqueuse colique amenant l'inflammation. De manière intéressante, des polymorphismes (SNP) dans le gène encodant SHP-2 ont été récemment associés à une susceptibilité accrue à développer une colite ulcéreuse chez des patients. Pris ensemble, ces résultats suggèrent donc que SHP-2 pourrait constituer une nouvelle cible dans le traitement des maladies inflammatoires intestinales.

Mots clés : SHP-2, protéine tyrosine phosphatase, inflammation intestinale, signalisation cellulaire, différenciation cellulaire

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX .....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
INTRODUCTION.....	1
1. Le système digestif.....	1
1.1. La digestion.....	1
1.1.1. Structure du système digestif .....	1
1.1.2. Fonctions du système digestif .....	1
1.2. Structure et fonctions de l'épithélium intestinal .....	2
1.2.1. L'intestin grêle .....	2
1.2.2. Le côlon.....	4
1.2.3. Les cellules épithéliales intestinales.....	5
1.2.3.1. La différenciation des cellules épithéliales intestinales.....	8
1.3. Les maladies inflammatoires intestinales (MII).....	12
1.3.1. Description des MII .....	12
1.3.2. Bris de la barrière épithéliale intestinale .....	13
2. La tyrosine phosphatase SHP-2.....	15
2.1. Définition .....	15
2.2. La signalisation régulée par SHP-2 .....	16
2.2.1. La voie des MAPK.....	18
2.2.1. La voie JAK/STAT .....	19
2.3. Les pathologies associées à la tyrosine phosphatase SHP-2 .....	21
2.3.1. Le syndrome de Noonan .....	21
2.3.2. Leucémies et autres cancers.....	22
2.3.3. Inflammation intestinale .....	22
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	26
MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	27
1. Matériel .....	27
1.1. Anticorps.....	27
1.2. Inhibiteurs.....	27
2. Méthodes.....	27
2.1. Croisements et génotypages.....	27
2.2. Injection au tamoxifène .....	28

2.3.	Index d'activité de la maladie .....	31
2.4.	Colorations histologiques.....	31
2.4.1.	Coloration Hématoxyline-Éosine.....	31
2.4.2.	Coloration à l'Alcian bleu .....	31
2.5.	Immunohistochimies .....	32
2.5.1.	Double marquage Alcian bleu/lysozyme.....	32
2.6.	Score histologique.....	32
2.7.	Immunobuvardages .....	32
2.8.	Extraction d'ARN et analyse qPCR.....	33
2.9.	Extraction d'ADN à partir de cæcums murins .....	34
2.11.	Culture cellulaire .....	36
2.11.1.	Lignée utilisée .....	36
2.11.2.	Traitements avec les inhibiteurs de Notch et de MEK .....	36
2.12.	Statistiques .....	36
	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>37</b>
1.	Modèle murin .....	37
1.1.	Les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> montrent une inhibition d'expression épithéliale de la tyrosine phosphatase SHP-2 suite aux injections de tamoxifène. ....	37
1.2.	La perte d'expression de SHP-2 dans l'épithélium intestinal adulte entraîne le développement rapide d'inflammation.....	37
1.3.	La signalisation cellulaire associée à la tyrosine phosphatase SHP-2 est modulée chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> après traitement de 18 jours de tamoxifène.....	41
1.4.	Le nombre de cellules caliciformes est diminué dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> ayant développé une inflammation intestinale.....	41
1.5.	Des cellules intermédiaires sont présentes dans le côlon proximal des souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> suite à 18 jours de traitement au tamoxifène. ....	44
1.6.	L'expression des gènes nécessaires à la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice de l'épithélium intestinal est affectée chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> présentant une inflammation intestinale	44
1.7.	La signalisation cellulaire Notch est peu modulée chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> suite à 18 jours de traitement au tamoxifène. ....	47
1.8.	Au dixième jour du traitement tamoxifène, les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> ne montrent pas de signes cliniques d'inflammation .....	47
1.10.	Les cellules intermédiaires sont absentes du côlon proximal des souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> traitées au tamoxifène pendant dix jours.....	52
1.11.	La signalisation Notch, associée à la différenciation des cellules caliciformes n'est pas modulée chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant 10 jours au tamoxifène.....	52
1.12.	La signalisation cellulaire régulée par SHP-2 semble peu affectée chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant 10 jours au tamoxifène. ....	54
1.13.	Les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant 12 jours au tamoxifène montrent déjà des signes d'inflammation intestinale. ....	54
1.14.	L'activation de la voie Notch accompagne la diminution du nombre de cellules positives à l'Alcian bleu à 12 jours de traitement tamoxifène .....	57
2.	Modèle de lignée cellulaire.....	60

2.1.	La lignée cellulaire LS174T répond bien aux inhibiteurs de la $\gamma$ -sécrétase et de MEK et l'inhibition de la voie ERK/MAPK semble avoir un effet activateur sur la voie Notch.....	60
2.2.	L'inhibition des voies Notch et ERK/MAPK dans les cellules LS174T module l'expression des gènes associés aux cellules de la lignée sécrétrice de l'épithélium intestinal .....	60
2.3.	L'inhibition de la voie ERK/MAPK active rapidement la voie Notch .....	62
	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>65</b>
1.	Impact de la délétion de SHP-2 dans les CEIs au stade embryonnaire en comparaison avec la délétion chez l'adulte .....	65
2.	Une différenciation aberrante des cellules caliciformes chez les souris déficientes pour l'expression de SHP-2 précède l'apparition de l'inflammation .....	72
3.	L'hyperactivation de la voie Notch semble impliquée dans les altérations de la différenciation des cellules caliciformes observées lors de la délétion d'expression de SHP-2 .....	77
	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>81</b>
	<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>83</b>
	<b>LISTE DES RÉFÉRENCES.....</b>	<b>84</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>92</b>

## LISTE DES FIGURES

Schéma 1 : Les différents types de cellules épithéliales différenciées de l'épithélium intestinal.....	3
Schéma 2 : Régulation de la différenciation des cellules épithéliales intestinales.....	9
Schéma 3 : Activation de la voie Notch.....	10
Schéma 4 : Des bris de la barrière épithéliale intestinale, lorsqu'ils sont combinés et chroniques, peuvent mener au développement d'inflammation intestinale. ....	14
Schéma 5 : Structure de la tyrosine phosphatase SHP-2.....	17
Schéma 6 : Implication de la tyrosine phosphatase SHP-2 dans les voies de signalisation ERK/MAPK et JAK/STAT. ....	20
Schéma 7 : Activation de la Cre recombinase inducible par injection de tamoxifène. ....	29
Schéma 8 : Schéma expérimental des injections de tamoxifène chez les souris contrôles et SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois. ....	30
Figure 1: Inhibition d'expression épithéliale de la tyrosine phosphatase SHP-2 chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> 10, 12 et 18 jours après la première injection de tamoxifène. ....	38
Figure 2 : Inhibition d'expression de la tyrosine phosphatase SHP-2 suite aux injections de tamoxifène chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> . ....	39
Figure 3 : Les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> développent de l'inflammation colique, et ce, dès le 18e jour après la première injection de tamoxifène.....	40
Figure 4 : Les signalisations ERK et STAT3 sont modulées chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> suite à un traitement au tamoxifène de 18 jours.....	42
Figure 5 : Diminution du nombre de cellules caliciformes et de l'expression de la mucine 2 chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> après traitement de 18 jours au tamoxifène.....	43
Figure 6 : Des cellules intermédiaires sont présentes dans le côlon proximal des souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> . ....	45
Figure 7 : L'expression des gènes nécessaires à la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice de l'épithélium intestinal est affectée chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> . ....	46
Figure 8 : La signalisation de Notch semble activée chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> . ....	48
Figure 9 : Absence d'inflammation chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> , dix jours après la première injection de tamoxifène. ....	50
Figure 10 : Diminution du nombre de cellules caliciformes et de l'expression de la mucine 2 chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> après traitement de dix jours au tamoxifène. ....	51
Figure 11 : Absence des cellules intermédiaires chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> après dix jours de traitement au tamoxifène.....	53
Figure 12: L'expression de HES1, de NIC et de KLF4 n'est pas significativement altérée chez les souris traitées au tamoxifène pendant dix jours. ....	55
Figure 13: Le niveau d'activation de STAT3 et de MEK est peu affecté chez les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> suite à un traitement au tamoxifène de dix jours. ....	56
Figure 14: Les souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> montrent des signes d'inflammation dès 12 jours de traitement au tamoxifène. ....	58

Figure 15: La diminution du nombre de cellules positives à l'Alcian bleu dans le côlon des souris SHP-2 <sup>CEI-KOER</sup> est associée à une suractivation de la voie Notch, à 12 jours de traitement au tamoxifène. ....	59
Figure 16: Validation de l'effet des inhibiteurs dans les cellules LS174T. ....	61
Figure 17: L'inhibition de la voie ERK/MAPK diminue l'expression de la mucine 2 dans les LS174T. ....	63
Figure 18: Activation rapide de la voie Notch suite à l'inhibition de la voie ERK/MAPK. ....	64



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Mutations dans le gène PTPN11, codant pour SHP-2, répertoriées dans différents types de cancers .....	23
---	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADAM10 :	ADAM metallopeptidase domain 10
AGR 2 :	Mammalian Anterior Gradient 2
ATG16L1 :	Autophagy related 16 like 1
ATOH1/MATH1 :	Atonal bHLH transcription factor
BCA :	Bicinchoninic acid
BrdU :	Bromodéoxyuridine
CBC :	Crypt Base Columnar
CO <sub>2</sub> :	Dioxyde de carbone
CSL :	CBF1- Suppressor of Hairless-LAG1
DAI :	Index d'activité de la maladie
DBZ :	Dibenzazépine
DCS :	Deep Crypt Secretory
DLL1, 3, 4 :	Delta Like canonical Notch Ligand 1, 3, 4
DMSO :	Dimethyl sulfoxide
DSS :	Dextran sodium sulfate
DTT :	Dithiothréitol
ECL :	Enhanced chemiluminescence
EDTA :	Acide éthylène-diamine tétracétique
EGF :	Epidermal Growth Factor
EMEM :	Eagle's Minimum Essential Medium
ERK :	Extracellular signal-Regulated Kinase
FITC-Dextran :	Fluorescein isothiocyanate-Dextran
FOS :	FOS proto-oncogene, AP*1 transcription factor subunit
GDP :	Guanosine diphosphate
GFI1 :	Growth Factor Independent 1
GRB2 :	Growth Factor Receptor Bound protein 2
GTP :	Guanosine triphosphate
HCL :	Hydrochloric acid
HEPES :	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HES1 :	Hairy and Enhancer of Split 1
HRP :	Horseradish peroxidase
IBD :	Inflammatory Bowel Disease
IgA :	Immunoglobuline A
IL-1 :	Interleukine 1
IL-10 :	Interleukine-10
JAG1, 2 :	Jagged1, 2
JAK :	Janus kinases
JMML :	Leucémie myélomonocytaire juvénile
JNK1, 2, 3 :	c-jun (N)-terminal kinases
KLF4 :	Kruppel-Like Factor 4
LGR5 :	Leucine riche repeat-containing G-protein coupled Receptors
MAM :	Microbial Anti-inflammatory Molecule
MAML1 :	Mastermind like transcriptional coactivator 1
MAPK :	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK1, 2 :	Mitogen activated protein kinase kinase
MII :	Maladies Inflammatoires Intestinales

MUC17 :	Mucine 17
MUC2 :	Mucine 2
MUC3 :	Mucine 3
MUC4 :	Mucine 4
MUC5AC :	Mucine 5AC
MYB :	MYB proto-oncogene, transcription factor
MYC :	MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
MYD :	Myeloid differentiation primary response 88
NaCl :	Chlorure de sodium
NaOH :	Hydroxyde de sodium
NGN3 :	Neurogénine 3
NP-40 :	Nonidet P-40
PA :	Phosphatase alcaline
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PFA :	Paraformaldéhyde
PTPN11 :	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
PVDF :	Polyfluorure de vinylidène
REG4+ :	Regenerating islet-derived family member 4,
RIPA :	Radioimmunoprecipitation assay
RTK :	Récepteur Tyrosine Kinase
SDS :	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE :	Sodium dodécylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SHP-2 :	Scr Homology 2 domain-containing Phosphatase 2
SOS :	Son Of Seveless
SOX9 :	Sex-determining region Y – box 9
SPDEF :	SAM Pointed Domain containing ETS transcription Factor
STAT1, 3 :	Signal Transducers and Activators 1, 3
TFF3 :	Trefoil Factor 3
TLR :	Toll-Like Receptor
TNF- $\alpha$ :	Tumor Necrosis Factor alpha
Tris :	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
WNT3 :	Wnt family member 3

## INTRODUCTION

### 1. Le système digestif

#### 1.1. La digestion

##### 1.1.1. *Structure du système digestif*

Le système digestif représente l'ensemble des organes participant à la digestion des aliments et à l'absorption des nutriments résultant de cette digestion. Les organes du système digestif peuvent être sous-divisés en deux grands groupes : les organes du tube digestif et les organes digestifs en périphérie du tube digestif. Lors de la prise alimentaire, la nourriture entre d'abord dans le tube digestif par la bouche. Elle sera ensuite introduite dans l'œsophage, via le pharynx, par le phénomène de déglutition, puis elle atteindra l'estomac (cardia, fundus, corps et pylore). Une fois la digestion terminée dans l'estomac, le chyme résultant entre dans la première partie de l'intestin grêle, le duodénum, pour ensuite continuer vers le jéjunum et l'iléon, les parties médiane et terminale de l'intestin grêle. Ensuite, le bol alimentaire résiduel entrera dans le côlon (caecum, côlon ascendant, côlon transverse, côlon descendant, côlon sigmoïde), puis finira sa course au rectum, pour être finalement évacué via l'anus. En plus des organes physiquement présents dans le tube digestif, le pancréas, le foie et la vésicule biliaire jouent aussi un rôle actif dans le processus de digestion (Marieb E, 2005).

Du début à la fin du tube digestif, les parois des organes du tube digestif sont toutes organisées de la même façon. Cette paroi est composée de quatre couches distinctes, soit la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. D'abord, la muqueuse, composée d'un épithélium simple prismatique, de la lamina propria et de la muscularis mucosae, est responsable des fonctions d'absorption et de sécrétion du tissu. La lamina propria contient les vaisseaux et certaines composantes du système immunitaire. Finalement, la muscularis mucosae est une fine couche de cellules musculaires, permettant le mouvement de la muqueuse. La sous-muqueuse, quant à elle, est responsable de l'alimentation du tissu, de par son riche réseau de vaisseaux sanguins et lymphatiques. La musculuse est responsable du mouvement péristaltique du tube digestif et la séreuse permet de protéger l'ensemble du tissu (Marieb, 2005).

##### 1.1.2. *Fonctions du système digestif*

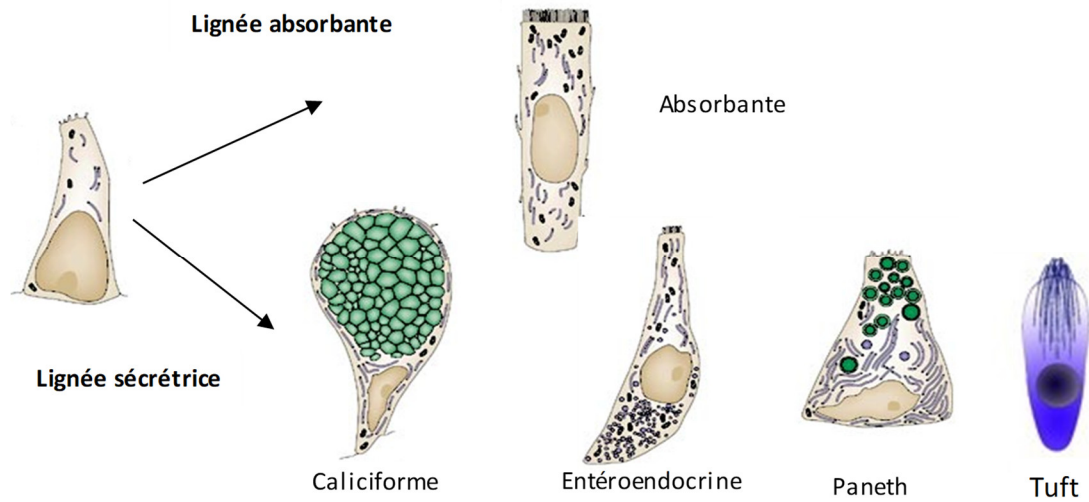
Le processus de digestion débute d'abord dans la bouche, où la nourriture est broyée par la mastication (digestion mécanique). La digestion des sucres complexes (polysaccharides et glycogène) débute aussi dans la bouche par la sécrétion d'amylase salivaire, une enzyme sécrétée par les glandes salivaires. Une fois la nourriture bien mastiquée, celle-ci est propulsée dans l'œsophage, via le

pharynx, par la déglutition. La nourriture sera poussée jusqu'à l'estomac par péristaltisme de l'œsophage. Une fois dans l'estomac, la nourriture subira deux types de digestions : une digestion mécanique et une digestion chimique. La digestion mécanique se produit suite à la contraction des muscles de l'estomac, particulièrement dans la partie terminale de l'estomac, le pylore. Les aliments sont brassés et pétris, ce qui a pour effet de faciliter leur dégradation. La digestion chimique des peptides sera ensuite faite par l'acide chlorhydrique (HCl), sécrété par les cellules pariétales, et par la pepsine, une enzyme sécrétée par les cellules principales. Le très faible pH de l'estomac est nécessaire pour dénaturer les peptides ingérés, mais aussi pour activer les enzymes de digestion. Le chyme sera ensuite introduit graduellement dans le duodénum. À cette étape, le chyme entrera en contact avec la bile, avec des enzymes digestives et avec des ions bicarbonates, ces derniers ayant pour rôle d'élever son pH. Ces différents produits sont sécrétés par les organes digestifs périphériques, soit le foie, la vésicule biliaire et le pancréas. Dans l'intestin grêle, les différents nutriments finiront d'être digérés, par les enzymes de la bordure en brosse, afin d'être absorbés par les cellules de l'épithélium. À la fin de l'intestin grêle, la majorité des nutriments est normalement complètement digérée et absorbée. Le côlon joue donc un rôle dans l'absorption de l'eau et de certaines vitamines (B et K), produites par les bactéries se trouvant dans sa lumière. Une fois l'eau absorbée, les fèces seront amenées au rectum, toujours par mouvement péristaltique, puis évacuées par l'anus (Marieb, 2005).

## 1.2. Structure et fonctions de l'épithélium intestinal

### 1.2.1. L'intestin grêle

L'intestin grêle est organisé en axes crypte-villosité. Cette structure permet d'augmenter la surface de contact de l'épithélium avec la lumière intestinale, et donc d'augmenter la capacité d'absorption des nutriments. L'épithélium de la crypte (crypte de Lieberkühn) contient les cellules souches, les cellules progénitrices, les cellules en processus de différenciation et les cellules de Paneth, celle-ci étant les seules cellules différenciées à se trouver dans la crypte. L'épithélium de la villosité, quant à lui, contient les cellules complètement différenciées, soit les cellules absorbantes, les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines (Schéma 1) (Crosnier *et al.*, 2006). Les caractéristiques et le rôle de chacune de ces cellules seront abordés dans une section suivante (1.2.3.). Le rôle de l'intestin grêle est de terminer la digestion des différents nutriments afin de permettre un maximum d'absorption avant l'arrivée dans le côlon. D'abord, dans le duodénum, le chyme sera



**Schéma 1 : Les différents types de cellules épithéliales différenciées de l'épithélium intestinal.**

Les cellules souches multipotentes de l'épithélium intestinal sont à l'origine de deux lignées cellulaires : la lignée absorbante menant à la différenciation des cellules absorbantes de l'épithélium intestinal et la lignée sécrétrice menant à la différenciation des cellules caliciformes, entéroendocrines, de Paneth et Tuft ; ces dernières sont présentes seulement dans l'intestin grêle. Schéma tiré et modifié de Crosnier *et al.*, 2006.

alcalinisé par les ions bicarbonates sécrétés par le pancréas, afin de protéger l'épithélium intestinal, sensible aux conditions trop acides. Le chyme y subira aussi une digestion chimique, par les enzymes provenant des sécrétions du foie, de la vésicule biliaire et du pancréas (Marieb, 2005). Une fois dans le jéjunum, le chyme sera en contact avec les enzymes de la bordure en brosse (sucrase-isomaltase, lactase, saccharase...) qui sont responsables de la digestion des disaccharides (lactose, saccharose, isomaltose) en monosaccharides (glucose, galactose, fructose) (Lovegrove *et al.*, 2015). Une fois dans l'iléon, la digestion et l'absorption des nutriments seront complétées, avant d'acheminer le chyme vers le côlon.

### 1.2.2. Le côlon

Contrairement à l'intestin grêle, le côlon est organisé en cryptes seulement. Les cellules souches se trouvent encore une fois au fond de la crypte, mais cette fois seule, puisque les cellules de Paneth sont absentes de l'épithélium du côlon normal. Les cellules souches donnent naissance aux cellules progénitrices, qui amorceront leur différenciation en montant dans la crypte afin de donner les cellules absorbantes, les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines, qui composeront l'épithélium colonique mature. Le rôle du côlon dans la digestion est d'absorber l'eau et certaines vitamines produites par le microbiote. Ce microbiote est beaucoup plus important en nombre et en espèces dans le côlon que dans l'intestin grêle.

#### 1.2.2.1. *Le microbiote intestinal*

Le microbiote, que l'on peut définir comme étant l'ensemble des micro-organismes (bactéries, levure, virus) commensaux présents sur et dans le corps humain, est de plus en plus considéré comme faisant partie de notre organisme. Bien que non essentiel, le microbiote contribue grandement au maintien d'une bonne santé, en faisant entrave aux bactéries pathogènes, par exemple. Comme l'a montré le « Human Microbiome Project Consortium », très peu de bactéries nuisibles pour la santé sont présentes dans le microbiote d'adultes en bonne santé (Huttenhower and Human Microbiome Project Consortium, 2012). À cet effet, le microbiote de l'intestin, qui compte la plus grande diversité d'espèces bactériennes (Huttenhower and Human Microbiome Project Consortium, 2012) joue un grand rôle dans l'homéostasie intestinale, notamment en compétitionnant avec les pathogènes pour les nutriments. Une dysbiose, donc un déséquilibre des espèces présentes dans le microbiote intestinal, est connue pour être présente chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales (MII) et pour jouer un rôle dans la pathogenèse de ces maladies (Li *et al.*, 2014).

### 1.2.3. Les cellules épithéliales intestinales

Comme mentionné précédemment, l'épithélium intestinal est composé principalement de quatre types de cellules épithéliales différenciées : les cellules absorbantes, les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth (absentes du côlon). Ces quatre types cellulaires peuvent être regroupés en deux lignées, soit la lignée absorbante, composée des cellules absorbantes et la lignée sécrétrice, composée des cellules caliciformes, des cellules entéroendocrines et des cellules de Paneth (Gerbe *et al.*, 2011). Toutes ces cellules différenciées proviennent d'une même cellule, la cellule souche « leucine riche repeat containing G-protein coupled receptors » (LGR5) positive, présente au fond des cryptes intestinales et coloniques. Les cellules de l'épithélium sont complètement renouvelées tous les trois à cinq jours, les cellules ayant migré jusqu'à l'extrémité de la villosité mourant par anoïkose (Barker *et al.*, 2007).

Les cellules souches LGR5+ ont été caractérisées en 2007, par Barker *et al.* Ces cellules étaient déjà connues sous le nom de « Crypt base columnar cells », cependant, leurs caractéristiques fonctionnelles n'étaient pas connues. L'identification de LGR5 comme étant un marqueur de ces cellules a permis leur caractérisation. Ces cellules prolifèrent activement, comme le montre l'expression de plusieurs marqueurs de prolifération cellulaire, comme le Ki67 ou encore le bromodéoxyuridine (BrdU) (Barker *et al.*, 2007). Par des essais avec le gène rapporteur *LacZ*, ils ont aussi montré que toutes les cellules épithéliales, autant dans l'intestin grêle que dans le côlon, proviennent de ces cellules LGR5+ (Barker *et al.*, 2007).

Les cellules absorbantes sont les cellules présentes en plus grand nombre dans l'épithélium intestinal. Elles possèdent une bordure en brosse à leur surface, formée par les microvillosités, ce qui leur permet d'augmenter leur surface de contact avec le contenu de la lumière intestinale et donc, d'augmenter la capacité d'absorption des nutriments, dans l'intestin grêle, et de l'eau, dans le côlon (Van der Flier *et al.*, 2009). Dans le cas de l'intestin grêle, la présence des microvillosités, ajoutée à la structure des villosités, permet une surface de contact maximale entre l'épithélium et la lumière intestinale. Ces cellules, comme toutes les cellules formant l'épithélium, sont maintenues entre elles par les complexes de jonctions apicales. Ces complexes sont formés par les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions serrées jouent un rôle de cloison et de perméabilité sélective de l'épithélium, empêchant, par exemple, les bactéries de pénétrer entre les cellules de l'épithélium pour atteindre les couches internes du tissu. De plus, elles délimitent les



domaines apicaux et basolatéraux. Les jonctions adhérentes et les desmosomes retiennent les cellules de l'épithélium ensemble, créant une adhérence intercellulaire ferme (Sánchez de Medina *et al.*, 2014).

Les cellules caliciformes sont les deuxièmes cellules les plus abondantes de l'épithélium intestinal. Leur nombre augmente selon l'axe rostral caudal, c'est-à-dire que le nombre de cellules caliciformes augmente progressivement du début de l'intestin grêle jusqu'à la fin du côlon distal, où le nombre de cellules caliciformes est à son maximum (Specian et Oliver, 1991). Dans l'intestin grêle, celles-ci sont présentes en plus grand nombre dans la crypte que dans la villosité, alors que dans le côlon, elles sont plus présentes dans le haut des cryptes et présentent de larges granules de sécrétion. Ces granules se retrouvent à la surface apicale des cellules, ce qui leur donne une allure de coupe en microscopie, d'où leur nom de cellules caliciformes (Specian et Oliver, 1991). Ces granules de sécrétion sont composés principalement de la mucine 2 (MUC2) qui, dans l'intestin, est la principale mucine sécrétée responsable de la formation de la couche protectrice de mucus (Johansson et Hansson, 2016). Certaines mucines sont sécrétées (MUC2 et MUC5AC) et d'autres mucines sont transmembranaires (MUC3, MUC4 et MUC17) (Johansson et Hansson, 2016). Les mucines sont des protéines hautement O-glycosylées capables de former des polymères « gel-likes » (Sánchez De Medina *et al.*, 2014). Cet assemblage permet de limiter l'accès à l'épithélium aux bactéries, en rendant leurs déplacements plus fastidieux. Dans le côlon, l'assemblage des mucines permet de générer deux types de couches de mucus, une couche interne et une couche externe. D'abord, la couche interne, directement en contact avec l'épithélium, est beaucoup plus compacte et les bactéries y sont pratiquement absentes. Celle-ci sert donc à maintenir les bactéries à distance de l'épithélium. Au contraire, la couche externe, beaucoup plus lâche, abrite les bactéries de la flore commensale (Johansson et Hansson, 2016). Cette différence dans la densité des couches de mucus vient de clivages protéolytiques réalisés par des protéases endogènes. En fait, les mucines formant la couche la plus dense sont clivées, ce qui permet la formation de la couche plus relâchée et, en parallèle, le renouvellement de la couche dense (Johansson et Hansson, 2016). En plus des mucines, les cellules caliciformes sécrètent d'autres types de protéines telles que le « trefoil factor 3 » ou TFF3, important pour les défenses immunitaires et dans la réparation de l'épithélium (Mashimo *et al.*, 1996).

Les cellules entéroendocrines sont les cellules retrouvées en plus faible nombre dans l'épithélium intestinal, représentant approximativement 1% du total des cellules épithéliales

intestinales (van der Flier et Clevers, 2009). Ces cellules sont responsables de la sécrétion d'hormones peptidiques impliquées dans le contrôle de la digestion. Il existe en fait une quinzaine de types de cellules entéroendocrines différentes, chacune ayant des produits de sécrétion différents, ainsi que des formes et des caractéristiques fonctionnelles différentes. (van der Flier et Clevers, 2009 ; Gribble et Reimann, 2016).

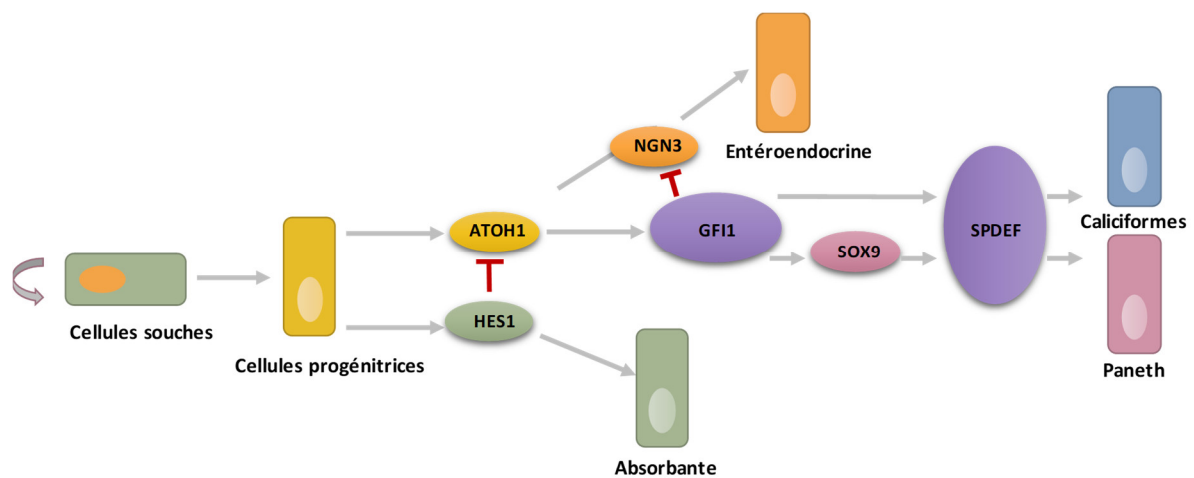
Les cellules de Paneth sont les seules cellules différenciées se trouvant au fond des cryptes. Précisément, elles se trouvent intercalées entre les cellules souches LGR5+, tout au fond de la crypte. Suite à leur différenciation, celles-ci redescendent vers le bas de la crypte, plutôt que de continuer leur ascension vers le sommet de la villosité, comme les autres cellules différenciées (Clevers and Bevins, 2013). De par leur localisation, les cellules de Paneth ont un renouvellement beaucoup plus lent que les autres cellules épithéliales intestinales. Celles-ci peuvent se trouver au fond de la crypte pendant 30 jours, contrairement aux autres types cellulaires qui sont exfoliés dès qu'ils atteignent le sommet de la villosité, pour un renouvellement tous les trois à cinq jours (Ouellette, 2011). Ces cellules sont facilement reconnaissables en microscopie électronique, puisque leur cytoplasme contient plusieurs granules de sécrétion très denses aux électrons (Clevers et Bevins, 2013). Ces granules contiennent divers peptides antimicrobiens, tels que les défensines et le lysozyme, permettant de maintenir une défense antimicrobienne dans la crypte et l'homéostasie du microbiote intestinal (Ouellette, 2011). En plus de leur rôle dans le maintien du microbiote, les cellules de Paneth sont importantes dans le maintien de la niche des cellules souches. Cette niche permet la survie et la prolifération des cellules souches, par la présence de plusieurs facteurs de croissance sécrétés par les cellules de Paneth tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), Wnt (Wnt Family Member 3) et DLL4 (ligand de Notch) (Sato *et al.*, 2011). En condition d'homéostasie intestinale, les cellules de Paneth ne sont présentes que dans l'intestin grêle. Dans le côlon, ces facteurs composant la niche des cellules souches sont, entre autres, sécrétés par les cellules « regenerating islet-derived family member 4 » (REG4+) positives « deep crypt secretory cells » (DCS) (Sasaki *et al.*, 2016) et probablement aussi par le mésenchyme sous-jacent. Dans certaines conditions pathologiques, telles que les MII, des cellules de Paneth dites « métaplasiques » peuvent être observées au fond des cryptes coloniques. En fait, bien que ces cellules soient connues pour exprimer des marqueurs de cellules de Paneth, tels que le lysozyme, elles expriment aussi des marqueurs de cellules caliciformes, telles que la mucine 2 (Ouellette, 2011). Il s'agirait donc plutôt de cellules « intermédiaires » possédant un statut de différenciation mixte, typique des deux types cellulaires, ceux-ci prenant leur origine des mêmes précurseurs.

### 1.2.3.1. La différenciation des cellules épithéliales intestinales

La différenciation des cellules épithéliales intestinales est un processus finement régulé. D'abord, les cellules souches au fond de la crypte sont maintenues dans un état prolifératif et non différencié. Ces cellules donnent naissance aux cellules progénitrices, ou « transit amplifying cells » qui, après un certain nombre de divisions cellulaires, vont se déterminer puis amorcer leur différenciation en fonction des deux lignées cellulaires présentes dans l'épithélium : la lignée absorbante et la lignée sécrétrice (Van der Flier *et al.*, 2009). Sous l'action du facteur de transcription HES1 (Hairy Enhancer of Split 1) et de son effet inhibiteur sur la transcription du facteur ATOH1 (Atonal bHLH Transcription factor) (MATH1 chez la souris), les cellules progénitrices seront dirigées vers la lignée absorbante. Donc, lorsque HES1 est exprimé, les cellules progénitrices se différencient directement en cellules absorbantes (Fre S *et al.*, 2005). Au contraire, lorsque HES1 n'est pas exprimé, l'expression de ATOH1 n'est pas réprimée et la différenciation en cellules sécrétrices est possible (Fre *et al.*, 2005). Suite à l'expression de ATOH1, l'expression de la neurogénine 3 (NGN3) permet directement la différenciation en cellules entéroendocrine (Jenny *et al.*, 2002). Pour ce qui est des cellules caliciformes et de Paneth, celles-ci nécessitent d'abord l'expression de GFI1 (Growth Factor Independent 1), un répresseur de transcription, qui aura pour effet de réprimer l'expression de NGN3 (Bjerknes et Cheng, 2010). À cette étape, la cellule progénitrice devient une cellule précurseur des types caliciformes/Paneth (Bjerknes et Cheng, 2010). L'expression de SPDEF (SAM Pointed containing ETS transcription Factor) permet la différenciation terminale des cellules caliciformes et des cellules de Paneth (Gregorieff *et al.*, 2009). Les facteurs de transcription KLF4 (Kruppel-Like Factor 4) et SOX9 (Sex-determining region Y- box 9) sont aussi respectivement essentiels à la différenciation complète et terminale des cellules caliciformes et des cellules de Paneth (Katz *et al.*, 2002 ; Mori-Akiyama *et al.*, 2007). Le Schéma 2 récapitule les différents facteurs impliqués, ainsi que leur effet sur la différenciation des cellules épithéliales intestinales.

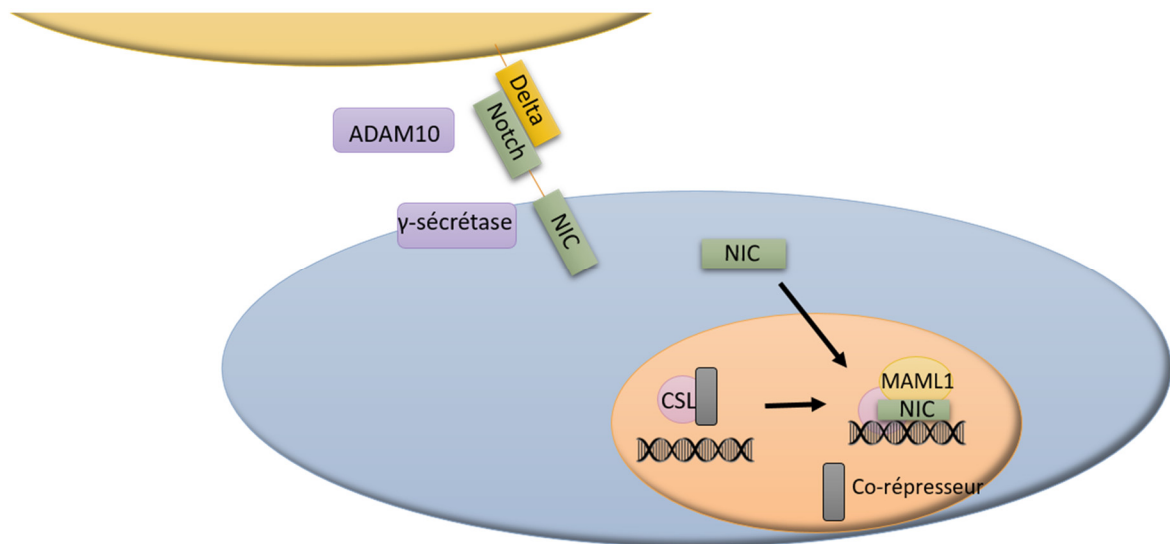
### 1.2.3.2. La voie Notch

La voie de signalisation Notch est la principale voie de signalisation impliquée dans la différenciation des cellules de l'épithélium intestinal. Il s'agit d'une voie de signalisation très bien conservée à travers les espèces (Bray, 2006). Le fonctionnement de la voie Notch est somme toute très simple. Deux cellules, portant chacune un ligand et un récepteur de Notch, entrent en contact, ce qui permet la liaison du ligand sur son récepteur (Bray, 2006). Il existe deux groupes



**Schéma 2 : Régulation de la différenciation des cellules épithéliales intestinales.**

La différenciation des cellules progénitrices débute par l'expression des facteurs de transcription HES1 et ATOH1. Selon l'expression de ces facteurs, les cellules se différencieront en cellules absorbantes ou sécrétrices. La différenciation en cellules absorbantes ne nécessite que l'expression de HES1. La différenciation en cellules entéroendocrines nécessite l'expression de NGN3. Les cellules caliciformes et de Paneth ont besoin de l'expression de GFI1 qui permet l'expression de SPDEF et qui inhibe l'expression de NGN3. En plus de GFI1 et de SPDEF, la différenciation en cellules de Paneth nécessite l'expression de SOX9.



**Schéma 3 : Activation de la voie Notch.**

Suite aux contacts cellule-cellule, les ligands de Notch (ex : Delta) lient leur récepteur. Suite à cette liaison, un premier clivage protéolytique est effectué, par la protéine ADAM10. Une fois ce clivage effectué, la  $\gamma$ -sécrétase procède ensuite au deuxième clivage protéolytique, permettant ainsi la libération du fragment intracellulaire clivé de Notch, NIC. NIC se déplace ensuite au noyau, se lie à son complexe transcriptionnel et active ses gènes cibles comme *HES1*, par exemple.

de ligands, les ligands Delta like canonical Notch ligand 1, 3 et 4 (DLL1, 3 et 4) et les ligands Jagged (JAG1 et JAG2) et quatre différents récepteurs Notch (1-4) (Bray, 2016). Cette liaison récepteur-ligand permet ensuite le début d'une série de clivages protéolytiques, qui mèneront éventuellement à l'activation de la voie. Le premier de ces clivages (S2) est réalisé par la métalloprotéase ADAM10 (ADAM metallopeptidase domain 10), sur la partie extracellulaire du récepteur Notch (Bray, 2006). Ce clivage permet de créer le substrat pour le second clivage protéolytique (S3), cette fois-ci réalisé par la  $\gamma$ -sécrétase. Ce deuxième clivage est un clivage de la portion transmembranaire du récepteur Notch, ce qui permet la libération de la portion intracellulaire clivée de Notch, NIC (Bray, 2006). Une fois libéré, ce NIC peut ensuite se rendre au noyau et lier son complexe transcriptionnel, composé des protéines CSL (CBF1-Supressor of Hairless-LAG1) et MAML1 (Mastermind Like transcriptional coactivator 1). Une fois lié à l'ADN, ce complexe permet la transcription des gènes de la voie, entre autres, le gène *HES1*, essentiel pour la différenciation des cellules épithéliales intestinales, particulièrement les cellules de la lignée sécrétrice. L'implication de la voie Notch dans la différenciation des cellules caliciformes est maintenant bien documentée. En effet, l'inhibition de la voie Notch, par la perte d'expression des récepteurs Notch ou de CSL, ou encore par utilisation d'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase, amène une augmentation importante du nombre de cellules caliciformes dans l'épithélium intestinal (van Es *et al.*, 2005 ; Fre *et al.*, 2005).

#### 1.2.4. La barrière épithéliale intestinale

L'épithélium intestinal, en plus de son rôle essentiel dans la digestion et dans l'absorption des nutriments, joue un rôle important de barrière. Cette barrière permet à l'épithélium d'être imperméable aux éléments indésirables présents dans la lumière intestinale, particulièrement aux bactéries, sans toutefois altérer sa capacité à absorber les nutriments (Sánchez de Medina *et al.*, 2014). Cette barrière peut être caractérisée de deux façons : barrière physique et barrière chimique. La barrière physique est mise en place par chacun des types cellulaires différenciés de l'épithélium intestinal. Les jonctions serrées qui unissent chacune des cellules épithéliales intestinales entre elles permettent d'établir une perméabilité sélective, et donc, de maintenir les bactéries dans la lumière intestinale, et donc à l'extérieur du tissu (Sánchez de Medina *et al.*, 2014). La barrière chimique sera mise en place par les cellules caliciformes et les cellules de Paneth, via leurs produits de sécrétion. Les cellules caliciformes sont responsables de la sécrétion de mucines, qui formeront la couche de mucus protectrice se trouvant à la surface de l'épithélium, tout au long de l'intestin grêle et du côlon. Ce mucus permet de maintenir une distance entre les bactéries, commensales aussi bien que

pathogènes, et les cellules de l'épithélium. Les fortes glycosylations des mucines permettent aussi d'emprisonner les bactéries pathogènes et de les éliminer via les fèces. Cette action se fait en collaboration avec les cellules de Paneth, qui sécrètent des peptides antimicrobiens. Ces peptides sécrétés peuvent cibler les bactéries pathogènes et empêcher leur prolifération ou leur progression vers l'épithélium (Sánchez de Medina *et al.*, 2014). En plus de la barrière mise en place directement par les cellules de l'épithélium et par leurs produits de sécrétion, le microbiote résidant dans la lumière intestinale contribue aussi au maintien de l'homéostasie intestinale et contribue au phénomène de barrière. Par exemple, les bactéries du microbiote peuvent stimuler la sécrétion de certaines cytokines (IL-8) qui elles peuvent ensuite stimuler la prolifération des cellules de l'épithélium (Sánchez de Medina *et al.*, 2014). La présence d'immunoglobuline A (IgA) sécrétée, de motifs de reconnaissance des bactéries sur les cellules épithéliales et de cellules immunitaires sous l'épithélium donnent une composante immunitaire à la barrière épithéliale, en plus de ses aspects de barrière chimique et physique. (Hindryckx *et al.*, 2016). L'aspect plus immunologique de la barrière ne sera pas abordé dans ce mémoire, qui se concentre sur les cellules épithéliales en elles-mêmes. Lorsque tous les éléments constituant la barrière épithéliale intestinale sont fonctionnels et en place, nous sommes en condition homéostatique. Toutefois, des bris de cette barrière peuvent déclencher une inflammation dans l'intestin qui, si elle est chronique, peut conduire au développement de MII.

### 1.3. Les maladies inflammatoires intestinales (MII)

#### 1.3.1 Description des MII

Les MII regroupent principalement deux maladies : la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn. Dans les deux cas, il s'agit de maladies impliquant une réponse immunitaire exacerbée (Wilson *et al.*, 2016). Ces deux maladies touchent principalement les jeunes adultes, et ce, toute leur vie, puisqu'il s'agit de maladies chroniques se présentant la plupart du temps sous forme d'épisodes de rémissions et de rechutes (Xavier et Podolsky, 2007 ; Sugimoto, 2008). La cause exacte associée au développement de ces deux maladies n'est toujours pas connue. En fait, un ensemble de facteurs serait responsable du développement de ces maladies. Depuis longtemps, une composante génétique semble liée au développement de ce type de maladie, puisqu'il n'est pas rare que plusieurs membres d'une même famille en soient atteints (Xavier et Podolsky, 2007). Le criblage du génome par association (*genome-wide-association studies* [GWAS]) a permis d'identifier plusieurs gènes de susceptibilité de la colite ulcéreuse et de la maladie de Crohn. À titre d'exemple, l'importance des anomalies de l'immunité innée dans la pathogénie de la maladie de Crohn a été confirmée par la

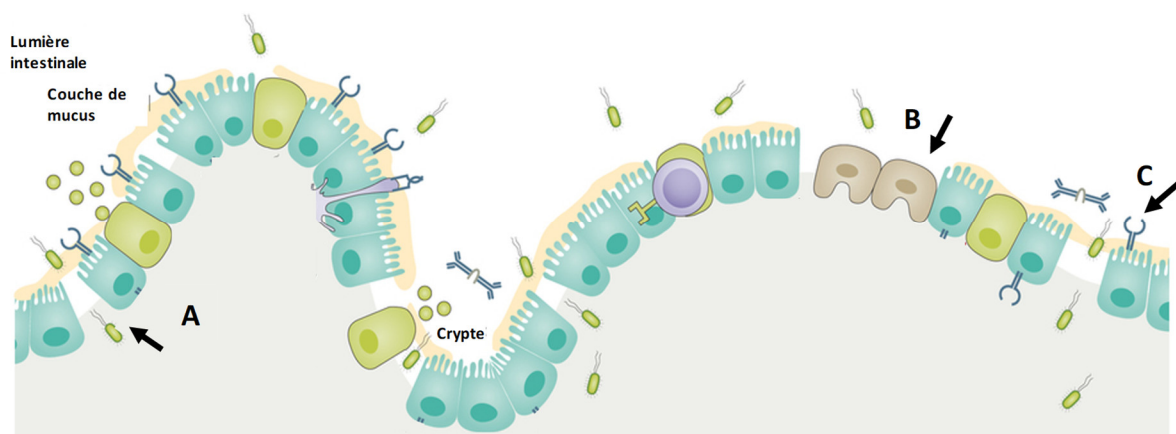
découverte des gènes de l'autophagie *ATG16L1* et *IRGM* (Cadwell *et al.*, 2008). En plus de la génétique, l'environnement ainsi que la composition du microbiote intestinal sont de plus en plus dans la mire des chercheurs qui tentent de déterminer les mécanismes responsables du développement de ces maladies (Xavier et Podolsky, 2007).

La différence majeure permettant de différencier la maladie de Crohn de la colite ulcéreuse est le degré d'atteinte à la muqueuse et la localisation de l'inflammation dans le tractus gastro-intestinal. En effet, l'inflammation causée par la colite ulcéreuse se trouve surtout dans la partie distale du côlon ainsi qu'au rectum, tandis que l'inflammation causée par la maladie de Crohn peut se retrouver dans tout le tube digestif, de la bouche à l'anus (Xavier et Podolsky, 2007). Une autre particularité de la maladie de Crohn est que l'inflammation est souvent pénétrante. Dans le cas de la colite ulcéreuse, l'inflammation se concentre surtout à l'épithélium alors que dans le cas de la maladie de Crohn, l'inflammation peut atteindre plusieurs couches du tissu, allant même parfois jusqu'à la musculature (Xavier et Podolsky, 2007). Brièvement, les symptômes des maladies inflammatoires intestinales incluent des troubles gastro-intestinaux comme des douleurs abdominales intenses, diarrhées sévères, saignement, et ce, jusqu'à la fatigue extrême et à certains problèmes extra-intestinaux (problèmes dermatologiques et articulaires) (Hindryckx *et al.*, 2016). Pour l'instant, les maladies inflammatoires sont majoritairement traitées avec différentes molécules capables de moduler l'activité du système immunitaire. Il ne s'agit pas d'une façon de guérir la maladie, mais bien d'une façon de diminuer les symptômes et de donner une qualité de vie acceptable aux patients (Wilson *et al.*, 2016).

### **1.3.2. Bris de la barrière épithéliale intestinale**

Comme mentionné précédemment, l'épithélium intestinal forme une barrière permettant une homéostasie intestinale, et donc des bris dans cette barrière peuvent mener au développement d'inflammation intestinale. Comme le montre le Schéma 4 (adapté de Hindryckx *et al.*, 2016), les bris dans la barrière peuvent être de plusieurs origines. D'abord, une dysfonction des jonctions, conduisant à une augmentation de la perméabilité de l'épithélium, peut permettre le passage de bactéries entre les cellules épithéliales jusqu'aux couches internes du tissu, où elles pourront induire une réponse immunitaire et faire des dommages (Xavier et Podolsky, 2007 ; Hermiston et Gordon, 1995). Une altération de la couche de mucus peut aussi être à l'origine d'un bris de la barrière. Il peut s'agir d'une diminution de son épaisseur, de son absence complète ou encore d'une





**Schéma 4 : Des bris de la barrière épithéliale intestinale, lorsqu'ils sont combinés et chroniques, peuvent mener au développement d'inflammation intestinale.**

Les bris de la barrière épithéliale intestinale peuvent inclure une augmentation de la perméabilité de l'épithélium, laissant pénétrer les bactéries dans les couches internes du tissu (A), une diminution de l'épaisseur ou une absence de la couche de mucus protectrice (B) et, éventuellement, un recrutement de cellules immunitaires, menant à la présence de différentes molécules ayant des effets pro-inflammatoires (C). Schéma tiré et adapté de Hindryckx *et al.*, 2016.

modification de sa viscosité. Dans tous les cas, ces altérations pourront, encore une fois, permettre un accès facilité à l'épithélium pour les bactéries (Xavier et Podolsky, 2007). Finalement, ces bris peuvent mener à une infiltration de cellules immunitaires à l'épithélium, résultant en la présence de médiateurs inflammatoires. Cette réponse immunitaire peut alors endommager l'épithélium si elle est inappropriée, comme dans le cas des maladies inflammatoires intestinales (McGuckin *et al.*, 2009).

### 1.3.3. *Modèles murins montrant l'importance de la barrière épithéliale intestinale*

Plusieurs modèles murins sont utilisés afin d'étudier les différents aspects de la barrière épithéliale intestinale. L'importance des jonctions cellule-cellule a été décrite par Michelle Hermiston et Jeffrey Gordon en 1995, par le biais d'un modèle murin exprimant un mutant dominant négatif de N-cadhérine dans les cellules épithéliales intestinales (Hermiston et Gordon, 1995). Ces souris, chez qui les jonctions adhérentes deviennent non fonctionnelles suite à l'expression du mutant N-cadhérine, développent rapidement une inflammation intestinale sévère, associée à une forte infiltration de cellules immunitaires dans l'épithélium ainsi que la présence d'abcès de crypte (Hermiston et Gordon, 1995). L'importance des cellules caliciformes et de la couche de mucus protectrice a aussi été grandement étudiée. Bien que leur rôle soit moins clair dans le cas de la maladie de Crohn (McGuckin *et al.*, 2009), les cellules caliciformes sont connues pour jouer un rôle important dans la pathogenèse de la colite ulcéreuse. En effet, les souris déficientes pour l'expression de *Muc2*, la mucine majoritairement sécrétée par les cellules caliciformes de l'intestin, développent spontanément et rapidement une inflammation colique et ont une sensibilité plus élevée à des stress inflammatoires, comme un traitement au dextran-sodium-sulfate (DSS) (Van der Sluis *et al.*, 2006). De plus, les cellules caliciformes sont présentes en plus petit nombre chez les patients en phase active de colite ulcéreuse, en comparaison aux patients sains (Strugala *et al.*, 2008). Ces résultats montrent bien l'importance de la couche de mucus dans la protection de l'épithélium intestinal. Plusieurs études ont aussi montré un rôle important pour la tyrosine phosphatase SHP-2 dans le maintien de la fonction barrière de l'épithélium intestinal, et donc de l'homéostasie intestinale (Coulombe *et al.*, 2013 ; Coulombe *et al.*, 2016). Ces études seront décrites plus en détail dans les paragraphes subséquents.

## 2. La tyrosine phosphatase SHP-2

### 2.1. Définition

Les protéines, et particulièrement les protéines de signalisation, peuvent subir plusieurs types de modifications post-traductionnelles. Les modifications post-traductionnelles sont des ajouts

de groupements divers sur des résidus protéiques spécifiques à la modification (Bray, 2006). Par exemple, les phosphorylations ne peuvent être retrouvées que sur les tyrosines, les sérines et les thréonines. Dans le cas de la phosphorylation, les enzymes responsables de catalyser cet ajout sont les kinases. À l'inverse, les enzymes responsables d'enlever ces groupements phosphates sont les phosphatases (Neel *et al.*, 2003). Ces phosphorylations peuvent avoir des effets activateurs ou inhibiteurs, dépendamment de la protéine impliquée, du contexte cellulaire et du type de phosphorylation (cet aspect sera abordé plus en détail dans le prochain paragraphe). Les tyrosines phosphatases peuvent se diviser en trois grandes familles : les tyrosines phosphatases transmembranaires, les « receptors-like » et les non transmembranaires.

Encodée par le gène *PTPN11*, la tyrosine phosphatase SHP-2, pour Src homology 2 (SH2) domain-containing phosphatase 2, est une tyrosine phosphatase appartenant à la sous-famille des protéines tyrosines phosphatases non transmembranaires contenant deux domaines SH2, capables de lier des tyrosines phosphorylées (Neel *et al.*, 2003). SHP-2 est exprimée de façon ubiquitaire, c'est-à-dire qu'elle est exprimée dans tous les tissus. La structure de la protéine SHP-2 est assez simple : deux domaines SH2 (N-SH2 et C-SH2) en N-terminal, un domaine phosphatase (PTP) et une queue C-terminale. En conformation inactive, son domaine N-SH2 est replié sur son domaine PTP, les domaines s'auto-inhibant. Pour l'activer, une protéine possédant deux tyrosines phosphorylées est nécessaire (Vogel *et al.*, 1992). D'abord, une de ses tyrosines va lier le domaine C-SH2, ce qui aura pour effet de lever l'inhibition allostérique sur le domaine N-SH2, celui-ci pouvant maintenant lier la deuxième tyrosine phosphorylée. Le domaine PTP étant aussi libéré, l'enzyme est donc maintenant active (Neel *et al.*, 2003).

## 2.2. La signalisation régulée par SHP-2

SHP-2 est connue pour moduler plusieurs voies de signalisation importantes dans la cellule (Tajan *et al.*, 2015). Ces interactions permettent à SHP-2 de réguler des phénomènes cellulaires importants, tels que la prolifération, la différenciation et la migration. L'expression de SHP-2 est essentielle, puisqu'il a été montré que la perte d'expression totale de SHP-2 dans un modèle murin amène la mort embryonnaire des souriceaux avant le jour embryonnaire 10.5, suite à de sévères défauts développementaux (Saxton *et al.*, 1997). Deux des principales voies connues pour être régulées par SHP-2 sont les voies « extracellular signal-regulated kinase » (ERK)/ « Mitogen activated protein kinases (MAPK) et « Janus kinases » (JAK)/ « Signal transducers and activators » (STAT). Comme ces deux voies sont importantes dans le maintien de l'homéostasie intestinale, le rôle de SHP-2 dans leur régulation sera décrit plus en détail.



**Schéma 5 : Structure de la tyrosine phosphatase SHP-2**

La tyrosine phosphatase possède deux domaines SH2 suivis de son domaine catalytique PTPase et d'une queue C-terminale.

### 2.2.1 La voie des MAPK

Les MAPK sont des sérines/thréonines kinases qui permettent la transmission de signaux, de la membrane vers le noyau. Il existe plusieurs classes de MAPK, mais les plus étudiées et caractérisées sont les « extracellular signal-regulated kinases 1/2 » (ERK1/2), les « c-jun (N)-terminal kinases 1/2/3 (JNK1/2/3) » et les isoformes de p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ) (Cargnello et Roux, 2011). Ces MAPK fonctionnent essentiellement de la même façon, soit en modules canoniques s'activant en cascade. Comme on peut le voir avec l'exemple des ERK1/2 MAPK sur le Schéma 5, il s'agit d'une cascade de phosphorylation, catalysée par une série de kinases s'activant en chaîne. Donc, en réponse à un facteur de croissance, le récepteur à tyrosine kinase activé pourra ensuite activer, par l'entremise de différentes molécules adaptatrices et du facteur d'échange SOS (Son Of Sevenless), la petite protéine G RAS. Une fois RAS activée, celle-ci pourra activer la MAPK kinase kinase (ARAF, BRAF et/ou CRAF). La kinase RAF phosphorylera (Sérine et thréonine) et activera les MAPK kinases 1/2 (MEK1/2), qui elles phosphoryleront les MAPK 1/2 (ERK1/2) sur un motif caractéristique Thr-Glu-Tyr (Cargnello, Roux, 2011). Les MAPK ERK1/2 phosphorylent alors plusieurs substrats incluant d'autres kinases comme p90RSK, capable de phosphoryler la protéine ribosomale S6, différents facteurs de transcription (FOS, CREB, etc.), et MNK1, impliquée dans l'initiation de la traduction des protéines (Xing *et al.*, 1996 ; Joshi et Platanias, 2014). Lorsque l'activation est soutenue, les ERK1/2 peuvent transloquer au noyau pour y réguler, par la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription (ELK1, ETS, c-myc, etc.), l'expression de plusieurs gènes associés à la prolifération, à la survie ou à la différenciation (Lenormand *et al.*, 1998 ; Wasylyk *et al.*, 1998). L'activation soutenue des kinases ERK1/2 a été d'ailleurs démontrée comme étant essentielle à la prolifération de plusieurs types cellulaires (Meloche et Pouyssegur, 2007), notamment des cellules épithéliales intestinales (Rivard *et al.*, 1999 ; Boucher *et al.*, 2004).

La régulation de la signalisation des ERK/MAPK par SHP-2 se situe principalement en amont de l'activation de RAS. Comme le montre le Schéma 5A, SHP-2 est en mesure d'interagir avec deux effecteurs importants de cette voie de signalisation, soit GRB2 et RASGAP (Tajan *et al.*, 2015). En réponse aux facteurs de croissance, SHP-2 est elle-même phosphorylée sur ses tyrosines 542 et 580, lui permettant maintenant d'agir comme protéine adaptatrice pour GRB2 (domaine SH2 sur tyrosine phosphorylée) qui elle recrute SOS. De plus, SHP-2 est capable de déphosphoryler RASGAP et ainsi de l'inactiver (Agazie et Hayman, 2003). RASGAP stimule l'hydrolyse du GTP en GDP par RAS agissant ainsi comme régulateur négatif de l'activité RAS. Son inhibition par SHP-2 a donc un effet positif sur

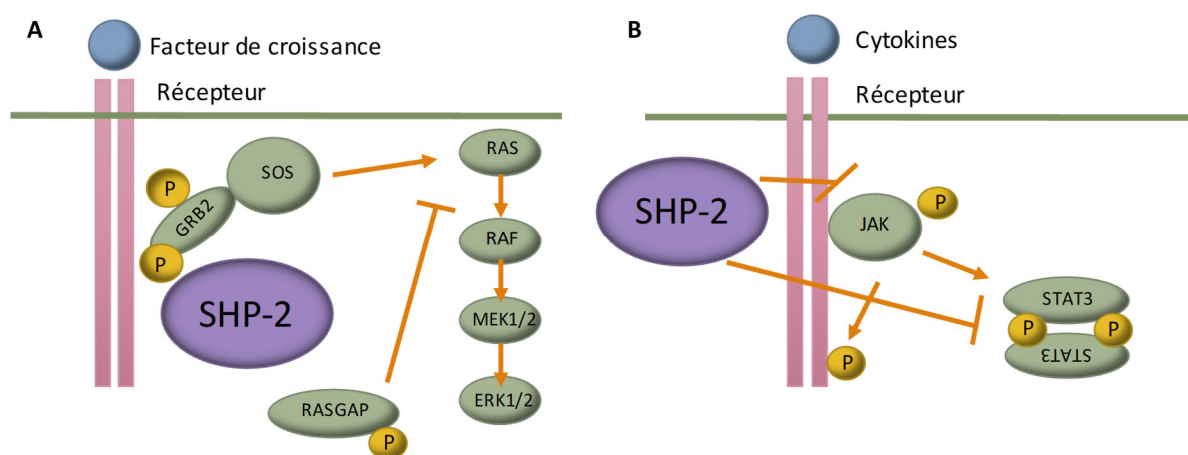
l'activation des MAPK en aval. En résumé, la tyrosine phosphatase SHP-2 régularise positivement la voie de signalisation ERK/MAPK.

À titre informatif, les isoformes de p38 sont activées principalement suite à des stress environnementaux ainsi qu'en réponse à diverses cytokines inflammatoires (Cuenda et Rousseau, 2007 ; Cargnello et Roux, 2011). D'ailleurs, dans l'inflammation, l'activation des p38 serait impliquée dans la biosynthèse de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'Interleukine-1 (IL-1) et le « Tumor necrosis factor alpha » (TNF- $\alpha$ ) (Lee *et al.*, 1994). Plusieurs études ont aussi montré l'implication de certaines isoformes de p38 dans la différenciation, notamment dans la différenciation des myoblastes (Li *et al.*, 2000) et des cellules épithéliales intestinales (Houde *et al.*, 2001; Laprise *et al.*, 2002). Bien que SHP-2 soit surtout connue pour réguler les ERK, elle semble aussi capable de réguler négativement p38, permettant ainsi la différenciation des adipocytes (He *et al.*, 2013). Du côté des JNK1/2/3 MAPK, celles-ci sont aussi activées par les facteurs de croissance et par différents stress tels que le stress oxydatif, le stress ionisant et le choc thermique (Cargnello et Roux, 2011). Conséquemment, dépendamment du stimulus en amont et du contexte cellulaire, l'activation des JNK contribuerait à la progression du cycle cellulaire (transition G1/S principalement) et à la promotion de la survie et/ou de l'apoptose (Wagner and Nebreda, 2009). Dans le cas des JNK, les rôles de SHP-2 sont parfois opposés, dépendamment du contexte. Dans le cas d'une activation des JNK par un stress cellulaire, SHP-2 serait un régulateur négatif (Shi *et al.*, 1998) alors que, dans le cas d'une activation par l'insuline, elle agirait plutôt comme un régulateur positif, en médiant l'activation de RAS (Fukunaga *et al.*, 2000).

### 2.2.1. La voie JAK/STAT

Chez les mammifères, la voie Janus Kinase (JAK)/ «signal transducers and activators of transcription » (STAT) est une des principales voies impliquées dans la signalisation des cytokines (Kaushal et Chorawala, 2012). L'activation de cette signalisation a été associée à plusieurs processus cellulaires comme la prolifération cellulaire, la différenciation et la migration (Rawlings *et al.*, 2004). Le Schéma 5B illustre sommairement le fonctionnement de cette voie. D'abord, une cytokine, par exemple, va lier son récepteur, ce qui entraîne sa dimérisation. Cette dimérisation permet l'activation des kinases JAK, qui vont d'abord s'autophosphoryler pour ensuite phosphoryler la partie intracellulaire du récepteur. Cette phosphorylation permet ensuite le recrutement des facteurs STAT, qui seront phosphorylés sur tyrosine à leur tour. Cette phosphorylation va permettre leur dimérisation, ainsi que leur translocation au noyau, où ils pourront transactiver la transcription de plusieurs gènes cibles (Coulombe et Rivard, 2016 ; Murray, 2007). SHP-2 est connue pour réguler

négativement la voie JAK/STAT1, entre autres lors de la réponse à l'interféron (You *et al.*, 1999). Comme l'a montré le groupe de Feng en 1999, les cellules n'exprimant plus SHP-2 réagissent



**Schéma 6 : Implication de la tyrosine phosphatase SHP-2 dans les voies de signalisation ERK/MAPK et JAK/STAT.**

**A.** En réponse aux facteurs de croissance, SHP-2 régule positivement la voie de signalisation ERK/MAPK de plusieurs façons. Par exemple, par déphosphorylation de la protéine adaptatrice GRB2, ce qui aura pour effet d'augmenter son affinité pour le facteur d'échange SOS. Une fois SOS lié à GRB2, celui-ci peut échanger le GDP de la petite protéine G RAS en GTP, activant donc RAS. SHP-2 peut aussi déphosphoryler et inactiver RASGAP, ce qui aura pour effet d'activer Ras. **B.** En réponse aux cytokines, SHP-2 est capable d'inhiber l'activation de la voie JAK/STAT3 en déphosphorylant directement JAK2 ou STAT3.

plus fortement à une stimulation à l'interféron alpha et gamma (You *et al.*, 1999). En plus de son effet sur STAT1, SHP-2 régularise négativement STAT3 (Xu et Qu, 2008). En effet, la phosphorylation activatrice de STAT3 (Y705) est augmentée dans les cellules souches embryonnaires invalidées pour SHP-2 (Chan *et al.*, 2003), ce qui est associé à une réduction de leur capacité à se différencier. SHP-2 semble aussi réguler négativement la voie JAK/STAT3 dans les cellules épithéliales intestinales, comme l'a publié le groupe de Nathalie Rivard en 2013 (Coulombe *et al.*, 2013).

## 2.3. Les pathologies associées à la tyrosine phosphatase SHP-2

### 2.3.1. Le syndrome de Noonan

Le syndrome de Noonan est une maladie congénitale, autosomale dominante, ayant une prévalence de 1 sur 1000 à 1 sur 2500 (Turner, 2014). Les signes cliniques les plus fréquents sont un faciès caractéristique, un cou court, une déformation du thorax et diverses cardiopathies (Romano *et al.*, 2010). Le diagnostic est parfois difficile, puisque plusieurs autres syndromes présentent des symptômes et des caractéristiques semblables à ceux du syndrome de Noonan (Romano *et al.*, 2010.) En 2001, Tartaglia *et al.* ont mis en lumière l'implication de SHP-2 dans le développement du syndrome de Noonan, ce qui permet maintenant de confirmer le diagnostic par test génétique (Tartaglia *et al.*, 2001). Chez les patients atteints du syndrome de Noonan, le gène *PTPN11*, codant pour la tyrosine phosphatase SHP-2, possède une mutation faux-sens gain de fonction (Tartaglia *et al.*, 2001.) Cette mutation se retrouve dans le domaine N-SH2, sur des résidus importants pour la transition de la conformation inactive vers la conformation active. Les résidus touchés seraient directement impliqués dans la liaison du domaine PTP. Ces mutations amèneraient un déséquilibre entre la forme inactive et active, la forme active étant plus présente qu'à la normale (Tartaglia *et al.*, 2001). Cette mutation serait responsable des cardiopathies associées au syndrome de Noonan, puisqu'il a été montré que SHP-2 est importante dans le développement embryonnaire des valves cardiaques sigmoïdes (Romano *et al.*, 2010). Malgré que les mutations de *PTPN11* soient les plus répandues dans les cas de syndrome de Noonan, plusieurs autres mutations sur des effecteurs de la voie ERK/MAPK ont été rapportées, notamment des mutations sur *KRAS*, menant à des symptômes plus sévères que dans le cas des mutations de *PTPN11* (Roberts *et al.*, 2013). Toutes ces mutations n'auront donc pas exactement les mêmes effets sur les symptômes développés ainsi que sur la sévérité de ceux-ci (Roberts *et al.*, 2013).



### 2.3.2. Leucémies et autres cancers

SHP-2 est connu pour jouer un rôle dans certains cancers, notamment dans les leucémies. Les leucémies sont des cancers touchant les cellules de la moelle osseuse, responsable de la production des différentes cellules sanguines. Une des formes de leucémie est la leucémie myélomonocytaire juvénile (JMML). Cette forme de leucémie est caractérisée par une prolifération excessive des cellules myélomonocytaire (Tartaglia *et al.*, 2003). Des mutations somatiques gain de fonction du gène *PTPN11* ont été retrouvées (D61Y et E76K) chez certains individus ayant développé une JMML. Comme dans le cas du syndrome de Noonan, ces mutations se trouvent sur le domaine N-SH2, sur des résidus interagissant avec le domaine PTP (Tartaglia *et al.*, 2003). Dans certains cas, ces patients développent aussi un syndrome de Noonan. Dans ce cas, il s'agit plutôt d'une mutation germinale de SHP-2, et donc, d'une mutation transmissible héréditairement (Tartaglia *et al.*, 2003). Des mutations somatiques de *PTPN11* ont aussi été retrouvées chez des patients ayant développé d'autres types de leucémies soient la leucémie lymphoblastique aigüe et la leucémie myéloïde aigüe (Tartaglia *et al.*, 2004). Ces mutations se situent aux mêmes endroits sur le gène et sont aussi des mutations gain de fonction.

En plus des leucémies, des mutations de SHP-2 seraient impliquées dans le développement d'autres types de cancers (Tableau 1) (Bentires-Alj *et al.*, 2004). Des mutations gain de fonction de SHP-2 ont, entre autres, été rapportées dans certains cas de tumeurs solides, comme des cancers du poumon ou colorectaux (Bentires-Alj *et al.*, 2004). Ces mutations se retrouvent encore une fois sur les domaines N-SH2 ou PTP de SHP-2.

SHP-2 est aussi associé au développement de cancers gastriques de par son association avec le facteur de virulence CagA d'*Helicobacter pylori*. CagA est exprimé chez les souches les plus virulentes de *H. pylori* (Higashi *et al.*, 2002). Après l'adhésion de *H. pylori* à l'épithélium gastrique, CagA est injecté dans les cellules où il sera phosphorylé et où il pourra s'associer à SHP-2 (Higashi *et al.*, 2002). Cette association permettra l'activation de SHP-2, celle-ci pouvant maintenant activer le sentier RAS-RAF-MEK-ERK, et donc induire la prolifération aberrante des cellules de l'épithélium gastrique (Hatakeyama, 2004).

### 2.3.3. Inflammation intestinale

En 2009, Narumi et collaborateurs ont découvert des polymorphismes sur le gène *PTPN11*. De manière intéressante, ces polymorphismes étaient fréquemment associés à

**Tableau 1 : Mutations dans le gène PTPN11, codant pour SHP-2, répertoriées dans différents types de cancers. Adapté de Bentires-Alj *et al.*, 2004 .**

Type de tumeur	Nbr. de cas	Exon	Mutations
Adénocarcinome du poumon (1)	118	3	E76V
Lignées cell. cancer poumon	65	2	V45L
		3	N58S
Cancer colorectal	196	3	E76G
AML (4)	65	3	D1Y
		3	E69V
		8	R289G
		13	G503V
Neuroblastome (3)	89	3	Y62C
		3	E69K
		13	T507K
Mélanome (1)	10	4	R138Q

une augmentation de la susceptibilité à développer une colite ulcéreuse, une MII (Narumi *et al.*, 2009). Comme ces polymorphismes ont été trouvés dans des régions introniques, il est difficile de prédire leur effet sur l'expression ou la fonction de la protéine et donc, de savoir quels sont les mécanismes responsables de cette susceptibilité accrue. En 2013, notre laboratoire a généré un modèle murin de délétion conditionnelle de SHP-2 spécifique à l'épithélium intestinal (SHP-2<sup>CEI-KO</sup>), afin d'étudier le rôle et la fonction de cette phosphatase dans l'homéostasie intestinale. De manière intéressante, les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> démontrent, un mois après leur naissance, des signes cliniques sévères d'inflammation, tels que de la diarrhée et des saignements rectaux. Une analyse histologique approfondie a confirmé que ces souris ont développé une inflammation sévère dans le côlon tant distal que proximal. Ce phénotype est associé à une diminution de l'activité de la signalisation ERK/MAPK et d'une suractivation de la signalisation JAK/STAT3, ce qui est cohérent avec la régulation de ces voies par SHP-2 (Coulombe *et al.*, 2013 ; Chan *et al.*, 2003 ; Tajan *et al.*, 2015). L'équipe a également vérifié si la fonction barrière de l'épithélium était perturbée, et ce, par la mesure de la perméabilité au « fluorescein isothiocyanate-dextran » (FITC-dextran) (Coulombe *et al.*, 2013). Une augmentation importante de la perméabilité de l'épithélium intestinale a été observée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, de même que des changements dans l'expression de protéines de jonctions serrées (Coulombe *et al.*, 2013). En plus de la barrière physique, la barrière chimique était également altérée, telle qu'observée par la diminution marquée du nombre de cellules caliciformes dans le côlon des souris expérimentales. Cette diminution des cellules caliciformes est associée à l'apparition de cellules de Paneth dites « métaplasiques » ou encore, de cellules intermédiaires, dans le côlon proximal des souris expérimentales (Coulombe *et al.*, 2016). Il est à noter que ces changements dans la fonction barrière (physique et chimique) ont été observés dès deux semaines après la naissance, donc bien avant l'apparition des signes cliniques d'inflammation. D'autres groupes ont également généré des souris déficientes pour l'expression de SHP-2 dans l'épithélium intestinal et ont observé un phénotype inflammatoire similaire (Heuberger *et al.*, 2014 ; Yamashita *et al.*, 2014). Un de ces groupes a aussi généré une souris qui exprimait une forme active de MEK1, la MAPK en amont des ERK1/2, et ont montré que la signalisation SHP-2-ERK/MAPK prévenait probablement l'inflammation en contrôlant la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice, plus spécifiquement le ratio cellules caliciformes/cellules de Paneth. Toutefois, à ce jour, les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant d'expliquer le rôle de la signalisation SHP-2-ERK/MAPK dans la différenciation des cellules sécrétrices de l'épithélium intestinal restent à élucider.

Un autre aspect intéressant de ce nouveau modèle d'inflammation intestinale SHP-2<sup>CEI-KO</sup> est la présence de dysbiose chez les souris expérimentales, et ce, rapidement après la naissance, et donc avant l'inflammation (Coulombe *et al.*, 2016). Les souris expérimentales présentent une diminution de l'abondance relative du phylum Firmicutes et une augmentation de l'abondance relative du phylum Bacteroidetes. Comme mentionné précédemment, le microbiote intestinal contribue au maintien de la fonction barrière de l'épithélium intestinal, en permettant une régulation des bactéries présentes dans la lumière intestinale, de diverses façons (Sánchez de Medina, 2014).

## HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les résultats récents obtenus dans notre laboratoire suggèrent que la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 contribue au maintien de l'homéostasie intestinale, du moins colique, puisque, suite à l'inhibition de son expression dans un modèle murin, les souris développent rapidement une inflammation intestinale sévère (Coulombe *et al.*, 2013, Yamashita *et al.*, 2014). Associées à cette inflammation, une diminution importante du nombre de cellules caliciformes ainsi qu'une apparition de cellules intermédiaires est observée (Coulombe *et al.*, 2016, Heuberger *et al.*, 2014). La délétion ayant lieu au stade embryonnaire, on ne peut pas exclure que des problèmes développementaux soient survenus résultant dans le phénotype inflammatoire observé chez les jeunes souris. Aussi, comme le microbiote s'établit rapidement après la naissance, il est possible que la composition de celui-ci soit altérée rapidement après la naissance chez les souris déficientes pour SHP-2. Une composition anormale de ce microbiote pourrait potentiellement expliquer le développement aussi rapide d'inflammation dans la muqueuse intestinale, comme c'est le cas dans les MII (Li *et al.*, 2014, Dubeau *et al.*, 2013). Or, nous savons aujourd'hui que la sévérité des symptômes et l'ampleur des atteintes à l'épithélium sont grandement dépendantes de l'âge qu'ont les patients qui développent ces maladies (Ruel *et al.*, 2014).

L'objectif général de mon projet était donc d'analyser le rôle et le mécanisme d'action de SHP-2 dans le maintien de l'homéostasie colique chez l'adulte. Mon hypothèse de recherche est que SHP-2 est nécessaire au maintien de l'homéostasie de l'épithélium colique chez l'adulte, plus spécifiquement, en contrôlant la fonction barrière l'épithélium colique, notamment la barrière de mucus. En effet, quelques évidences récentes provenant de divers groupes montrent une corrélation entre le niveau d'activation de la voie SHP-2-ERK/MAPK et la différenciation des cellules caliciformes (Coulombe *et al.*, 2013 ; Heuberger *et al.*, 2014 ; Gagné-Sansfaçon, Langlois *et al.*, en préparation); par contre, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués restent à élucider.

Les objectifs spécifiques de mon projet étaient de **1-** déterminer l'impact de la perte d'expression de SHP-2 dans l'épithélium colique de la souris adulte, plus spécifiquement sur la différenciation des cellules de l'épithélium, sur la composition de la flore intestinale et sur l'homéostasie inflammatoire ; **2-** d'analyser le rôle de la signalisation ERK/MAPK, effectrice de SHP-2 dans la différenciation des cellules caliciformes.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel

#### 1.1. Anticorps

L'anticorps dirigé contre l'actine (clone 4, MAB1501R) provient de EMD millipore (Etobicoke, ON, Canada). Les anticorps reconnaissant les formes phosphorylées de ERK1/2 (T202/Y204, #9101), de MEK (S217/221, #9121S) et de STAT3 (Y705, #9145) ainsi que les anticorps reconnaissant le fragment clivé de Notch (NICD) (#4147S), HES1 (#11988S), KLF4 (#12173S) et la forme totale de STAT3 (#4904) proviennent de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Les anticorps ciblant SHP-2 (C-18, sc-280), la forme totale de ERK (ERK2) (C-14, sc-154) et la forme totale de MEK (MEK-2) (N-20, sc-524) ont été achetés de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). L'anticorps contre le lysozyme (A0099) provient de la compagnie Dako (Agilent Technologies, Mississauga, ON, Canada). Les anticorps secondaires anti-lapin « horseradish peroxidase » (HRP) (NA931V) et anti-souris HRP (NA934V) ont été achetés de GE Healthcare Life Sciences (Mississauga, ON, Canada). Les anticorps secondaires anti-lapin phosphatase alcaline (PA) et anti-souris PA proviennent de Promega (Madison, WI, USA). Tous les anticorps ont été utilisés selon les recommandations des fabricants.

#### 1.2. Inhibiteurs

L'inhibiteur de la gamma-sécrétase, le dibenzazépine (DBZ), a été acheté de Cayman Chemical (14627-1). L'inhibiteur de MEK, le CI-1040 (PD184352) nous a gracieusement été donné par la compagnie Pfizer (Groton, MA, USA) ou encore acheté de Cayman Chemical (11580-10).

### 2. Méthodes

#### 2.1. Croisements et génotypages

Les souris *SHP-2<sup>flox-flox</sup>* (F3) nous ont gracieusement été fournies par le Pr. Gen-Sheng Feng (University of California, San Diego, CA, USA) (Zhang *et al.*, 2004). Suite à leur arrivée, elles ont été dérivées pendant neuf générations avec des souris C57BL/6 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Les souris transgéniques C57BL/6 9KbVilCreERT2 (*villine-CreER*) générées par la Pr Sylvie Robine (Institut Curie-CNRS, Paris, France) (Marjou *et al.*, 2004) nous ont été gracieusement fournies par Pr Claude Asselin (Université de Sherbrooke, QC, Canada), une fois qu'elles ont été dérivées.

Pour générer les souris ayant la perte d'expression conditionnelle de SHP-2 à l'épithélium intestinal, des souris *SHP-2<sup>flox-flox</sup>* ont été croisées avec des souris *villine-CreER*. Ce croisement nous permet d'obtenir des souris *SHP-2<sup>flox-wt</sup>* ; *villine-CreER*. Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris *SHP-2<sup>flox-flox</sup>*, afin d'obtenir des souris *SHP-2<sup>flox-flox</sup>* ; *villine-CreER*. Chez ces souris, l'expression

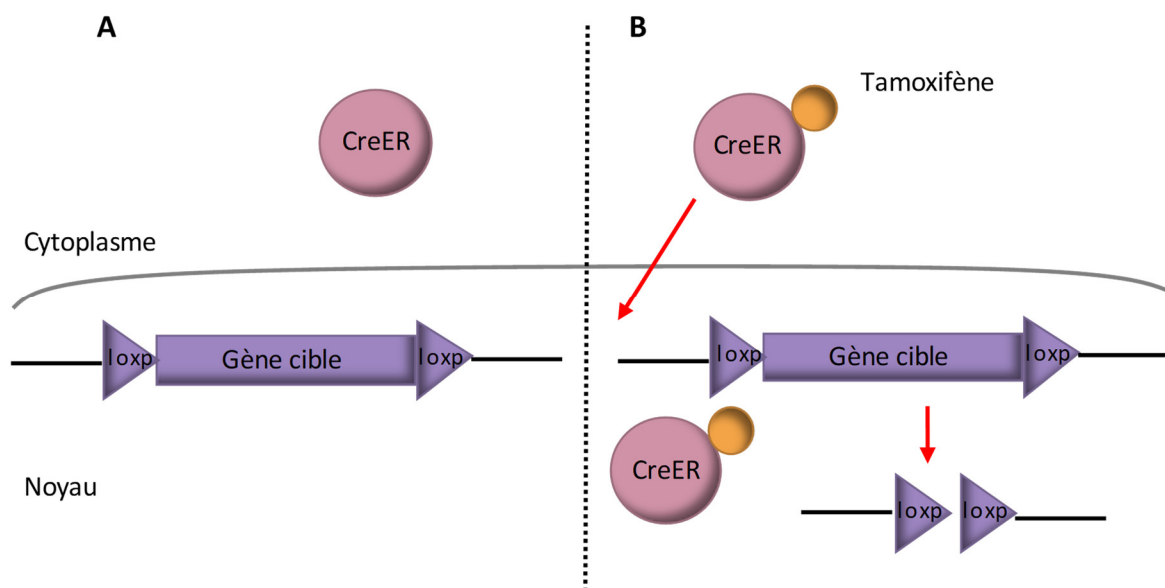
de l'enzyme Cre recombinase est exprimée sous le contrôle du promoteur de la villine, une protéine exprimée exclusivement dans les cellules de l'épithélium intestinal, ce qui permet d'avoir une délétion de SHP-2 seulement dans ces cellules (Wang *et al.*, 2016). Dans ce cas-ci, la Cre recombinase est inducible, c'est-à-dire qu'elle est active seulement en présence de tamoxifène (analogue de l'oestrogène). En effet, la Cre recombinase inducible est fusionnée à un récepteur aux oestrogènes, ce qui la séquestre dans le cytoplasme, la rendant incapable d'exercer sa fonction. Une fois le tamoxifène lié sur son récepteur, la Cre recombinase peut transloquer au noyau et procéder à la recombinaison homologue entre deux séquences *loxP* (Schéma 6).

Pour le génotypage des souris, des bouts d'orteils ont d'abord été prélevés chez des souriceaux âgés de quatre et sept jours. L'ADN génomique a par la suite été extrait par digestion dans 100 µl de NaOH 2.5 mM, EDTA 0.2mM pendant une heure à 95°C. La solution est ensuite neutralisée dans 100 µl de Tris-HCl 40 mM, pH5.5 (Truett *et al.*, 2000). Les réactions de PCR de génotypage ont par la suite été effectuées, comme décrites précédemment (Zhang *et al.*, 2004 ; Madison *et al.*, 2002).

Tous les croisements et les expériences menées sur les souris ont été approuvés par le comité éthique de protection des animaux de la Faculté de médecine et sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke.

## 2.2. Injection au tamoxifène

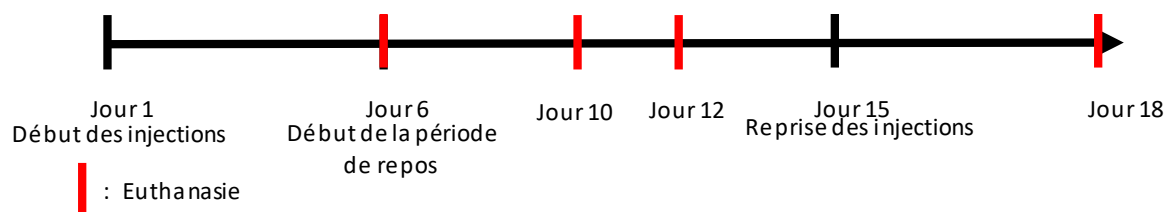
Le tamoxifène (100 mg) (13258-500, Cayman Chemical) a été resuspendu dans un millilitre d'éthanol 100%, puis chauffé brièvement à 75°C, pour faciliter la dissolution. Par la suite, le tamoxifène en solution a été dilué à nouveau dans neuf millilitres d'huile de maïs (Sigma) de façon stérile, aliquoté et congelé (les aliquots de tamoxifène décongelés n'ont jamais été recongelés et réutilisés par la suite). Les souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ont vécu en condition normale (eau et nourriture à volonté) jusqu'à trois mois, puis ont reçu des injections intrapéritonéales de 100 µl de tamoxifène à une concentration de 10mg/ml. Le schéma (Schéma 7) expérimental général est le suivant : les injections ont eu lieu pendant cinq jours consécutifs, suivi de neuf jours de repos, puis pendant trois jours consécutifs, suivi de l'euthanasie, au 18<sup>e</sup> jour (N ≥ 8). Des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ont aussi été euthanasiées à six jours et dix jours afin de vérifier le temps de traitement nécessaire permettant d'obtenir une perte d'expression de SHP-2 à l'épithélium intestinal (N = 2). D'autres souris ont été euthanasiées à dix (N ≥ 4) et douze jours (N ≥ 4), afin d'analyser la progression de l'inflammation intestinale. Les injections ont été réalisées avec des seringues d'allergies de 1cc



**Schéma 7 : Activation de la Cre recombinase inducible par injection de tamoxifène.**

**A.** La séquence d'un récepteur aux oestrogènes (RE) est d'abord ajoutée à la séquence codante de la Cre recombinase. Suite à cet ajout, la Cre recombinase synthétisée sera séquestrée dans le cytoplasme. **B.** Le tamoxifène se lie au RE, ce qui entraîne la translocation de la Cre au noyau. Une fois au noyau, celle-ci est en mesure de procéder à la délétion de la séquence se trouvant entre les séquences loxp.





**Schéma 8 : Schéma expérimental des injections de tamoxifène chez les souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois.**

Les injections ont débuté au jour 1, à raison de 1mg/souris/jour en injection intrapéritonéale, et se sont terminées au jour 5. La période de repos sans injection a débuté au jour 6. Une cohorte de souris a été euthanasiée au jour 10 ( $N \geq 4$ ) puis une autre au jour 12 ( $N \geq 4$ ). Les injections de tamoxifène ont repris au jour 15, toujours à la même concentration, jusqu'à l'euthanasie de la dernière cohorte, à 18 jours ( $N=8$ ).

(SS-01A2713, Terumo Medical Products, NJ, USA). Les souris ont été élevées et traitées ensemble, peu importe leur génotype.

### 2.3. Index d'activité de la maladie

L'index d'activité de la maladie (DAI) (Cooper *et al.*, 1993) est évalué selon des critères macroscopiques pendant l'euthanasie des animaux et permet l'évaluation de la sévérité des signes cliniques d'inflammation intestinale. Chacun des critères est évalué sur une échelle de zéro à quatre, quatre indiquant la condition la plus sévère. D'abord, avant de procéder à l'euthanasie, la présence de saignements rectaux est évaluée. Par la suite, lors de l'euthanasie, la dureté des fèces ainsi que la présence de sang dans les fèces sont évaluées, à partir des fèces présentes dans la partie terminale du côlon. Finalement, lorsque le côlon est complètement vidé de ses fèces, il est possible d'évaluer la dureté du côlon, en appliquant une légère pression sur le tissu à l'aide d'une pince à dissection. Le score résultant nous permet d'évaluer la sévérité des signes cliniques d'inflammation intestinale chez nos individus.

### 2.4. Colorations histologiques

Les tissus des souris contrôles et des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ont été fixés toute la nuit, à 4°C, dans de la paraformaldéhyde (PFA) 4% (P6148, Sigma-Aldrich). Les tissus ont par la suite été cirulés et inclus dans de la paraffine (Surgipath Paraplast, Leica Biosystems, ON, Canada). Par la suite, des coupes d'une épaisseur de 5 µM ont été déposées sur des lames Denville Ultra™ (M1021, Harvard Scientific).

#### 2.4.1. Coloration Hématoxyline-Éosine

Les colorations hématoxyline-éosine ont été réalisées par la Plateforme d'histologie et de microscopie électronique l'Université de Sherbrooke (Sherbrooke, QC, Canada). Les photos ont été prises à l'aide d'un Nanozoomer 2.0 RS (Hamamatsu Photonics, Bridgewater, NJ, USA) et elles ont été analysées à l'aide du logiciel NDP.view2 (Hamamatsu Photonics).

#### 2.4.2. Coloration à l'Alcian bleu

Pour les colorations à l'Alcian bleu, les lames de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ont été déparaffinées dans du xylène puis réhydratées. Elles ont par la suite été mises dans une solution d'acide acétique 3% pendant trois minutes, puis dans une solution d'acide acétique Alcian bleu 1% (pH 2.5) (K066-802, Poly-Scientific, Bay Shore, NY, USA) pendant 30 minutes. Les lames ont par la suite été contre-colorées avec du Nuclear Fast-Red pendant 45 secondes, afin de colorer les noyaux.

Les lames ont ensuite été déshydratées et montées avec du Permout (SP15-100, Fisher Scientific) et les photos ont été prises à l'aide d'un Nanozoomer 2.0 RS. Des décomptes du nombre de cellules caliciformes par crypte ont été faits, à l'aide du logiciel d'analyse NDP.view2.

## 2.5. Immunohistochimies

Les tissus des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ont été déparaffinés dans le xylène et réhydratés avant d'être placés dans une solution de 10 mM d'acide citrique pH 6 pour être bouillis au micro-ondes. La suite du protocole a été réalisée selon les recommandations de la compagnie DAKO (K4011, DAKO). Les lames ont par la suite été déshydratées et montées avec du Permout (SP15-100, Fisher Scientific). Les photos des immunohistochimies ont été prises avec un Nanozoomer 2.0 RS et elles ont été analysées avec le logiciel NDP.view2.

### 2.5.1. Double marquage Alcian bleu/lysozyme

Les doubles marquages à l'Alcian bleu et l'immunohistochimie dirigée contre le lysozyme ont été faits en commençant d'abord par l'immunohistochimie. Le protocole de la compagnie DAKO a été suivi jusqu'à l'étape de la contre-coloration. À ce moment, le protocole de la coloration à l'Alcian bleu a été suivi. Les lames ont par la suite été déshydratées et montées avec du Permout et les photos du marquage ont été prises avec un Nanozoomer 2.0 RS et analysées à l'aide du logiciel NDP.view2.

## 2.6. Score histologique

Le score histologique est évalué selon divers critères, à partir de coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine. Ces différents critères permettent d'évaluer l'étendue des dommages à la muqueuse, et donc d'évaluer le degré d'inflammation intestinale. Les critères sont les suivants : étendue des dommages à la muqueuse, présence et degré d'infiltration de cellules immunitaires, présence ou absence d'abcès de cryptes, présence ou absence d'une diminution du nombre de cellules caliciformes, augmentation de l'épaisseur du muscle. Plus la valeur du score est haute, plus l'étendue et la sévérité de l'atteinte à la muqueuse sont grandes.

## 2.7. Immunobuvardages

Des enrichissements de muqueuse de côlon proximal et de côlon distal ont été prélevés chez les souris contrôles et chez les souris expérimentales (SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>) à dix et dix-huit jours après la première injection de tamoxifène. Les enrichissements de muqueuse ont été prélevés par grattage de l'intérieur du tissu avec une lamelle de verre, puis rapidement congelés dans de l'azote liquide dans du tampon RIPA (Radiommunoprecipitation assay buffer) froid (50mM Tris-HCL, pH8, 150mM

NaCl, 0.5mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% Na Deoxycholate, 0.1% SDS, 1mM DTT, 40mM B-glycérophosphate, 1mM fluorure phénylméthylsulfonyl, 1µg/mL leupeptine, 1.4µg/mL pepstatine, 1µg/mL aprotinine et 200µM orthovanadate.) Les échantillons ont été conservés à -80°C. À la décongélation, les échantillons ont été lysés par TissueLyser LT (Qiagen, MD, USA) avant d'être homogénéisés par rotation pendant 30 minutes, à 4°C, centrifugés à 13 000 rpm pendant cinq minutes et dosés à l'aide de la méthode BCA (Bicinchoninic acid) (Smith *et al.*, 1985). Les échantillons ont été préparés avec du tampon laemmli 4x (2-mercaptoethanol 0.1%, bleu de bromophénol 0.0005%, glycérol 10%, SDS 2%, Tris-HCl 63 mM, pH6.8). Des quantités de 25 µg à 50 µg de protéines ont été séparées sur gel SDS-PAGE (Sodium dodécylsulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis), puis transférées sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (IPVH00010, EMD Millipore). Les membranes ont ensuite été colorées au rouge Ponceau, afin de s'assurer de la bonne qualité des échantillons, et bloquées dans une solution de « phosphate buffer saline » (PBS) 1% ; Tween 0.05% contenant 5% de lait en poudre, avant d'être incubées avec les différents anticorps primaires à 4°C, pendant toute la nuit. Suite à des lavages, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires pendant 1h à la température de la pièce avant d'être révélées par « enhanced chemiluminescence » (ECL) ou par phosphatase alcaline. Le réactif permettant de révéler la phosphatase alcaline, le CDP-star® est commercialisé par Life Technologies (T2305, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et le réactif ECL permettant de révéler la HRP est fait maison. 100 µL de luminol 250 mM (123072, Sigma Aldrich), 50 µL d'acide *p*-coumarique 90 mM (C9008, Sigma Aldrich) et 6 µL de peroxyde d'hydrogène 30% (216763, Sigma Aldrich) sont ajoutés dans 20 mL de Tris-HCl pH 8.5. Le luminol et l'acide *p*-coumarique sont dilués dans du « dimethyl sulfoxide » (DMSO) (W387520, Sigma Aldrich). Les immunobuvardages ont ensuite été quantifiés par densitométrie, à l'aide du logiciel ImageJ (National Institute of Health, Maryland, USA).

## 2.8. Extraction d'ARN et analyse qPCR

Pour les tissus de souris, des enrichissements de muqueuse ont été prélevés dans les différents segments du côlon (proximal et distal). Ces prélèvements ont été placés dans 600 µL de tampon RLT (Qiagen), congelés rapidement dans l'azote liquide et puis entreposés à -80°C jusqu'à l'extraction. Pour l'extraction, les échantillons ont été décongelés rapidement en les plaçant brièvement à 37°C et lysés par TissueLyser LT (Qiagen). Les échantillons ont par la suite été centrifugés, afin d'éliminer les débris de lyse.

Pour les cellules, deux rinçages avec du PBS 1x froid ont été réalisés avant d'ajouter 600 µL de tampon RLT par puits ou par pétri. Les cellules ont par la suite été décollées à l'aide d'un grattoir cellulaire, congelées rapidement dans l'azote liquide et entreposées à -80°C, jusqu'à l'extraction. Pour l'extraction, les échantillons ont été décongelés rapidement en les plaçant brièvement à 37°C. Des « up-and-down » ont été faits avec des aiguilles de 20G pour bien lyser les cellules. Les échantillons ont ensuite été centrifugés, afin d'éliminer les débris cellulaires.

L'extraction d'ARN a été faite avec le « kit » RNeasy de la compagnie Qiagen (74106). Les échantillons ont été traités en suivant le protocole de la compagnie, resuspendus dans de l'eau sans RNase et dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Une transcription inverse a ensuite été réalisée sur les divers échantillons, afin d'obtenir un ADN complémentaire, analysable en PCR quantitative en temps réel. La transcription inverse a été faite en suivant le protocole de la compagnie Roche pour le produit Transcriptor Reverse Transcriptase (03531317001, Roche, QC, Canada), en utilisant une concentration d'ARN de 500ng. Afin d'éliminer les contaminations aux RNases, du « Protector RNase inhibitor » (3335399001, Roche) a été ajouté au mélange de réaction des transcriptions inverses.

Les analyses de PCR quantitative en temps réel ont été réalisées par les membres de la Plateforme de RNomique de l'Université de Sherbrooke. Dans le cas des analyses chez la souris, l'expression des gènes analysés a été normalisée sur l'expression des trois gènes de références suivants : *Psmc4*, *Pum1*, *Tbp*. Dans le cas des analyses sur les cellules humaines en culture, l'expression des gènes analysés a été normalisée sur l'expression des trois gènes de références suivants : *RPL13A*, *MRPL19*, *PUM1*.

## 2.9. Extraction d'ADN à partir de cæcums murins

D'abord, les cæcums ont été prélevés lors de l'euthanasie des différentes cohortes de souris puis congelés rapidement dans l'azote et conservés à -80°C. Afin de procéder à l'extraction, les fèces ont été retirées du caecum et resuspendues dans 400 µL de tampon de lyse (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA et 4% SDS). Le tout a été transféré dans un tube vissé de 1.5 mL contenant 250 µL de billes de verre de 0.1 mm. Les échantillons ont été homogénéisés à 6500 rpm pendant une minute (répéter trois fois). Les échantillons ont ensuite été incubés à 95°C pendant 15 minutes dans un agitateur à 1000 rpm. Les échantillons ont ensuite été mis sur glace pendant cinq minutes avant de répéter l'étape d'homogénéisation (3x 1 minute, 6500 rpm). Les échantillons ont

ensuite été centrifugés pendant dix minutes à 1300 rpm à la température de la pièce. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube de 1.5 mL et 40 µL d'acétate de sodium 3M et 1 mL d'éthanol 100% ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été placés à -80°C pendant 10 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à 13 000 rpm. Les surnageants ont été retirés, les culots rincés avec de l'éthanol 70% et séchés. Les culots ont été dissous dans 200 µL de tampon TE + 2 µL de ARNase A dans DNase (10 mg/mL) et incubés pendant 30 minutes à 37°C. Les prochaines étapes ont été réalisées à l'aide des réactifs du kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (# 51504, Qiagen). 200 µL de tampon AL + 15 µL de Protéinase K ont été ajoutés. Les échantillons ont été vortexés 15 secondes avant d'être incubés 30 minutes à 70°C. 200µL d'éthanol 100% ont été ajoutés, les échantillons ont été vortexés et centrifugés rapidement avant d'être transférés dans une colonne QIAamp et centrifugés à 13 000 rpm pendant 1 minute, à température de la pièce (TP°). Les colonnes ont été placées sur de nouveaux tubes collecteurs, 500 µL de tampon AW1 ont été ajoutés puis les colonnes ont été centrifugées à 13 000 rpm pendant 1 minute, à TP°. Les colonnes ont été placées sur de nouveaux tubes collecteurs, 500 µL de tampon AW2 ont été ajoutés puis les colonnes ont été centrifugées à 13 000 rpm pendant 1 minute, à TP°. Les colonnes ont ensuite été placées sur de nouveaux tubes collecteurs et centrifugées à 13 000 rpm pendant 1 minute, afin de bien les sécher. Elles ont été transférées sur des tubes de 1.5 mL et 50 µL de tampon AE ont été ajoutés. Les colonnes ont été centrifugées à 13 000 rpm pendant 1 minute. L'éluat a ensuite été repassé sur la colonne afin d'augmenter la concentration en ADN de l'échantillon. Les échantillons ont ensuite été conservés à -20°C.

## 2.10. Séquençage du gène de l'ARNr 16s bactériens

Les échantillons d'ADN provenant de fèces ont été utilisés afin de séquencer le gène codant pour l'ARNr 16S bactérien. L'utilisation de ce gène permet d'identifier précisément les différentes espèces bactériennes présentes dans au sein d'un échantillon. Ce gène possède des séquences très conservées, permettant des études d'évolution et des séquences très variables, permettant l'identification précise des différentes espèces bactériennes présentes. La technique utilisée dans ce cas-ci est la technique de séquençage Illumina (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). Le séquençage a été fait à l'aide de l'appareil MiSeq d'Illumina de la plateforme RNomique de la Faculté de médecine et sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke. Les amorces ont été élaborées afin de cibler les régions V3 et V4 du gène de l'ARNr 16s. Les détails théoriques concernant le séquençage peuvent être trouvés sur le site internet de la compagnie. Le séquençage ainsi que l'extraction de l'ADN à

partir des fèces ont été réalisés par Mme Mandy Malick, stagiaire postdoctorale au laboratoire de Pr Éric Massé, du département de Biochimie de la Faculté de médecine et sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke.

## 2.11. Culture cellulaire

### 2.11.1. Lignée utilisée

Afin de réaliser les expériences *in cellulo*, les cellules provenant de la lignée LS174T (ATCC® CL-188™) de cellules épithéliales de cancer colorectal ont été utilisées. Il s'agit de cellules humaines provenant d'un adénocarcinome colorectal (Duke's, type B) possédant une activation des oncogènes suivants : *MYC*, *MYB*, *RAS*, *FOS*, *P53*. Ces cellules sont caractérisées par leur capacité à exprimer des marqueurs morphologiques et fonctionnels de cellules caliciformes sous l'effet de l'inhibition soutenue de la voie Notch (Tom *et al.*, 1976).

### 2.11.2. Traitements avec les inhibiteurs de Notch et de MEK

Les cellules ont été cultivées dans du milieu EMEM (320-005-CL, Wisent) additionné de 10% de sérum bovin fœtal (Wisent), de tampon HEPES (330-050-EL, Wisent), et de Glutamax (35050061, Gibco), à 37°C, 5% de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Les inhibiteurs utilisés (Dibenzazépine et CI-1040) ont été resuspendus dans du DMSO, la condition contrôle correspondant donc à des cellules traitées avec du DMSO seul. Les cellules ont étéensemencées sur plaque de six puits. Les traitements avec les inhibiteurs ont débuté 48h post-ensemencement et ont duré 96h. Un changement de milieu, ainsi que l'ajout d'inhibiteurs frais, a été fait après 48h de traitement. Les cellules ont par la suite été lysées. Les cellules ont été rincées par deux lavages avec du PBS 1x froid, puis lysées dans du tampon laemmli 1x (sans bleu de bromophénol), pour les lyses protéiques et dans 600 µL de tampon RLT, pour les lysats d'ARN. Les échantillons ont été conservés à -20°C pour les lysats protéiques et, suite à une congélation rapide à l'azote liquide, à -80°C pour les lysats d'ARN.

## 2.12. Statistiques

Les analyses statistiques ainsi que les graphiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Un test de Mann-Whitney a été fait pour les analyses chez la souris et un test de Student, pour les analyses chez les cellules en culture. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque l'erreur était  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.001$  (\*\*\*) et  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*).

## RÉSULTATS

### 1. Modèle murin

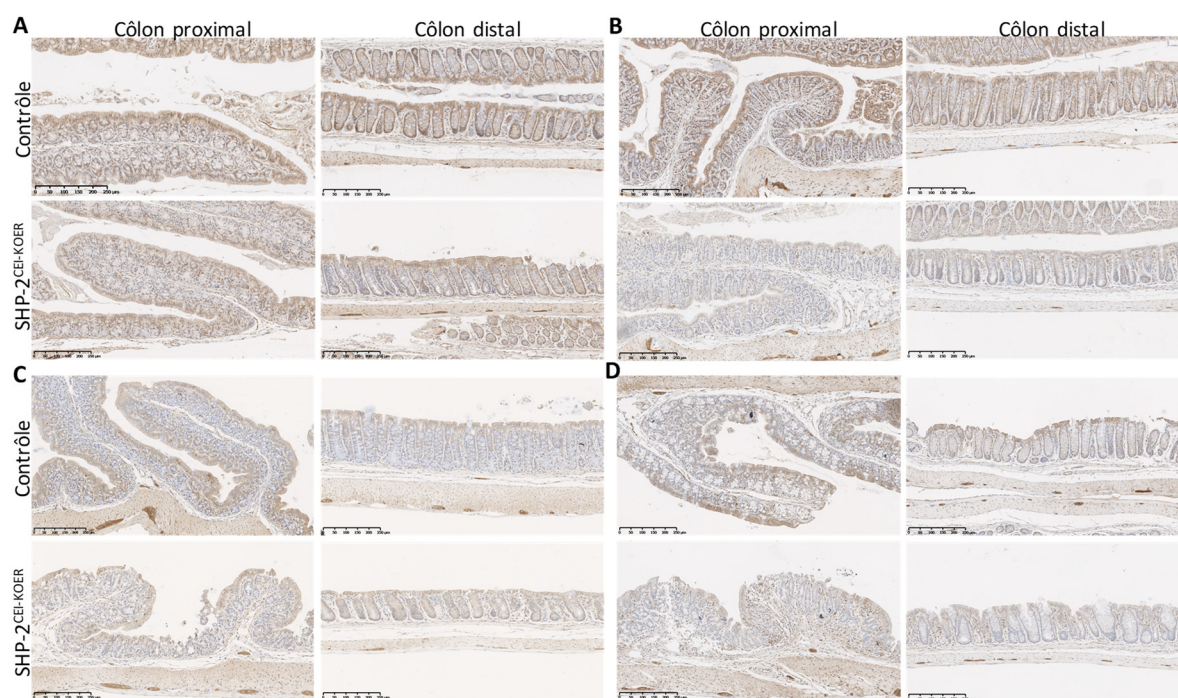
#### 1.1. Les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> montrent une inhibition d'expression épithéliale de la tyrosine phosphatase SHP-2 suite aux injections de tamoxifène.

Afin d'obtenir la perte d'expression de SHP-2 dans les cellules de l'épithélium intestinal adulte, des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois ont reçu des injections intrapéritonéales de tamoxifène. Dans le cas des souris exprimant une *villine-CreER*, le tamoxifène, en se liant à son récepteur (RE) sur la Cre, permet à celle-ci d'entrer au noyau et de procéder à la recombinaison homologue entre les séquences *loxP* (Schéma 6). Pour ensuite valider la perte d'expression de SHP-2, des immunohistochimies dirigées contre SHP-2 (Figure 1) et des immunobuvardages d'extraits d'enrichissements de muqueuses de côlon proximal (Figure 2) ont été réalisés. Six jours après la première injection de tamoxifène, la perte d'expression de SHP-2 à l'épithélium n'est pas observable (Figure 1A.). Par contre, dès le dixième jour après la première injection de tamoxifène, la perte d'expression épithéliale de SHP-2 est visible et maintenue jusqu'au jour 18. Les immunohistochimies ont aussi permis de valider que la perte d'expression était spécifique à l'épithélium et continue, du début du côlon proximal jusqu'à la fin du côlon distal. Ces résultats ont donc permis de valider que le modèle de délétion conditionnelle de SHP-2 à l'épithélium, à l'âge adulte, est fonctionnel.

#### 1.2. La perte d'expression de SHP-2 dans l'épithélium intestinal adulte entraîne le développement rapide d'inflammation

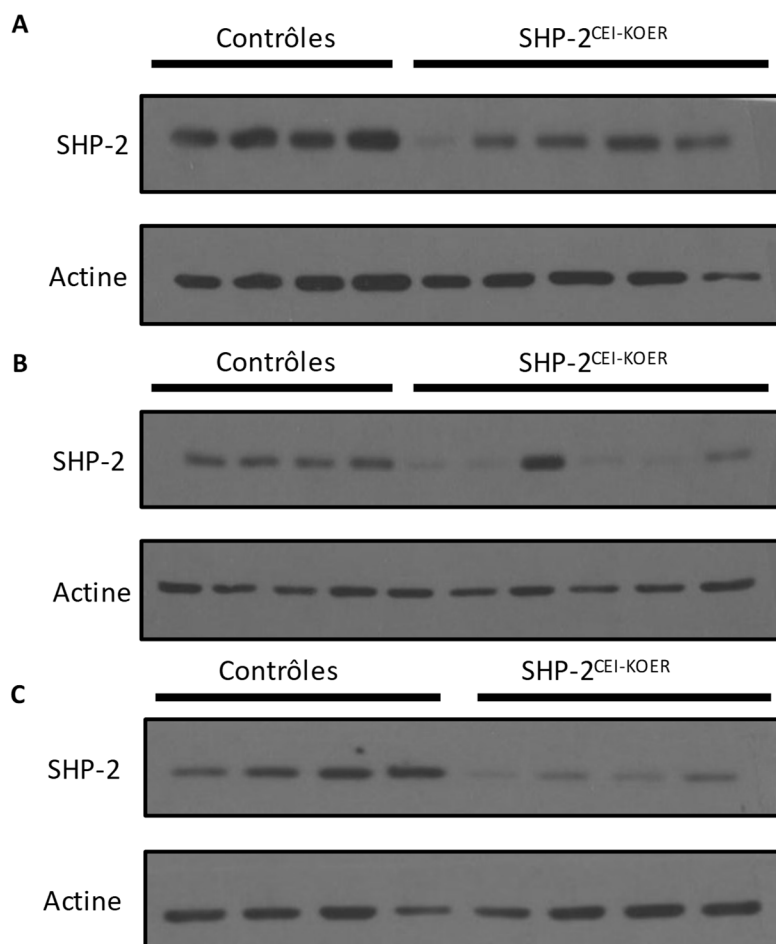
En comparaison avec les souris contrôles traitées au tamoxifène, les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées au tamoxifène pendant 18 jours ont rapidement et significativement perdu du poids pendant le traitement (Figure 3A). À l'euthanasie, au 18<sup>e</sup> jour de traitement tamoxifène, ces mêmes souris ont montré des signes cliniques d'inflammation, comme en témoigne l'index d'activité de la maladie (Figure 3B). Par exemple, les souris expérimentales souffraient de diarrhées et présentaient des saignements rectaux, ces symptômes étant absents chez les souris contrôles. Suite à l'analyse des coupes histologiques, des anomalies ont été observées dans le côlon des souris expérimentales en comparaison avec les souris contrôles. Les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> présentent une infiltration importante de cellules immunitaires, des abcès de cryptes ainsi qu'une abrasion de l'épithélium de surface (Figure 3C). À partir des coupes histologiques et des observations mentionnées, un score histologique a été calculé (Matériel et méthodes, 2.6.) et celui-ci est significativement augmenté chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> en comparaison avec les souris contrôles (Figure 3D). Ces divers résultats ont donc





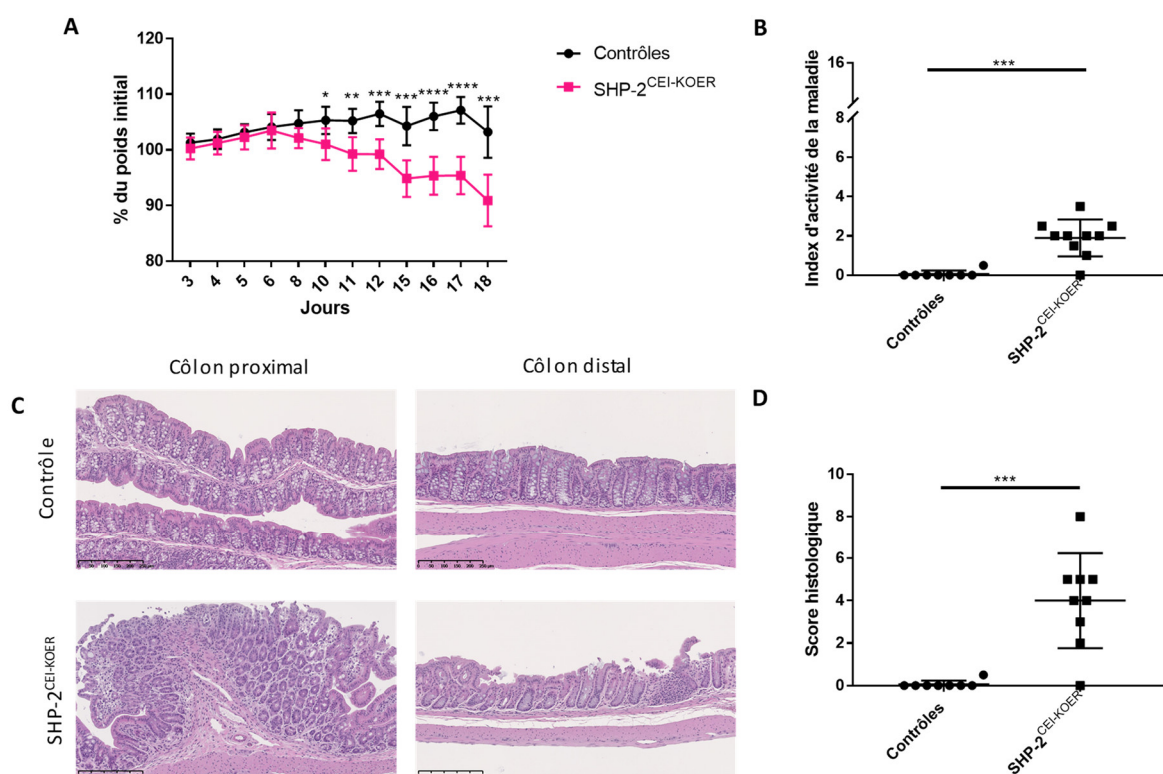
**Figure 1: Inhibition d'expression épithéliale de la tyrosine phosphatase SHP-2 chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> 10, 12 et 18 jours après la première injection de tamoxifène.**

Immunohistochimies réalisées sur des coupes en paraffine de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de 3 mois à six (A), dix (B), douze (C) et dix-huit (D) jours après la première injection de tamoxifène (barre d'échelle : 250μm). N ≥ 2.



**Figure 2 : Inhibition d'expression de la tyrosine phosphatase SHP-2 suite aux injections de tamoxifène chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>.**

Immunobuvardages d'enrichissements de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> après 10 (A), 12 (B) et 18 (C) jours de traitement.



**Figure 3 : Les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> développent de l'inflammation colique, et ce, dès le 18e jour après la première injection de tamoxifène.**

**A.** Courbe de poids des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, traitées pendant 18 jours au tamoxifène. **B.** Index d'activité de la maladie des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, au 18e jour de traitement au tamoxifène (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ . **C.** Coloration hématoxyline-éosine de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, traitées pendant 18 jours (barre d'échelle : 250 $\mu$ m). **D.** Score histologique, évalué à l'aide des colorations hématoxyline-éosine, des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, traitées pendant 18 jours au tamoxifène (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ .  $N \geq 8$ .

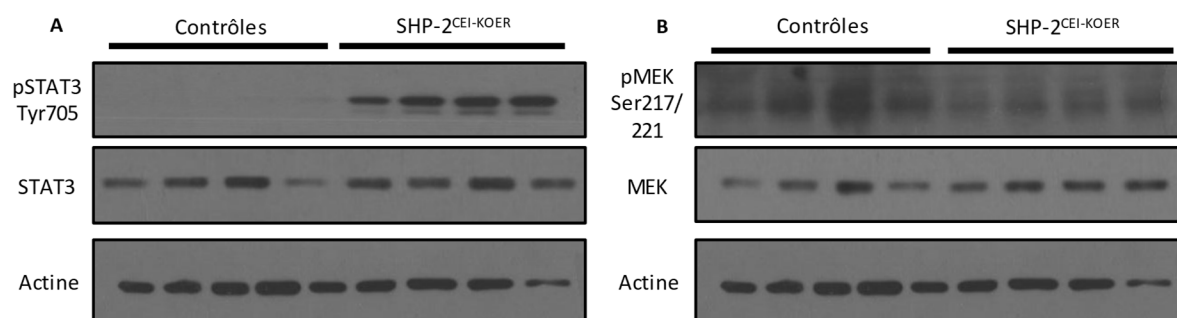
permis de confirmer que les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, traitées au tamoxifène, développent une inflammation intestinale rapidement suite à la perte d'expression de SHP-2 à l'épithélium.

### 1.3. La signalisation cellulaire associée à la tyrosine phosphatase SHP-2 est modulée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> après traitement de 18 jours de tamoxifène.

Comme discuté dans l'introduction, la tyrosine phosphatase SHP-2 est connue pour réguler diverses voies de signalisation, particulièrement les voies ERK/MAPK et JAK/STAT (Schéma 5). De cette façon, SHP-2 est en mesure de moduler plusieurs processus cellulaires, tels que la différenciation et la prolifération. Par immunobuvardage d'extraits d'enrichissement de muqueuse de côlon proximal, le niveau d'activation de ces deux voies de signalisation a été analysé. D'abord, l'activation de la voie des ERK/MAPK est visualisée, entre autres, par une phosphorylation de la kinase MEK1, sur ses sérines 217 et 221. Comme le montre la figure 4B, les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> montrent une phosphorylation plus faible de MEK1 que les souris contrôles (\*  $p \leq 0.0286$ ), ce qui se traduit par une diminution d'activité de la voie. À noter que la phosphorylation a aussi été analysée et qu'elle aussi diminuée chez les souris expérimentales (résultat non montré). Quant à la voie JAK/STAT3, son activation se produit suite à la phosphorylation de STAT3 sur sa tyrosine 705. La figure 4A permet de voir, chez les souris expérimentales, une augmentation de la phosphorylation de STAT3 sur sa tyrosine 705, ce qui témoigne d'une augmentation de son activation chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>. Ces immunobuvardages permettent donc de voir que, suite à la diminution d'expression de SHP-2 dans l'épithélium intestinal, les voies de signalisation qui sont sous sa régulation directe sont également modulées.

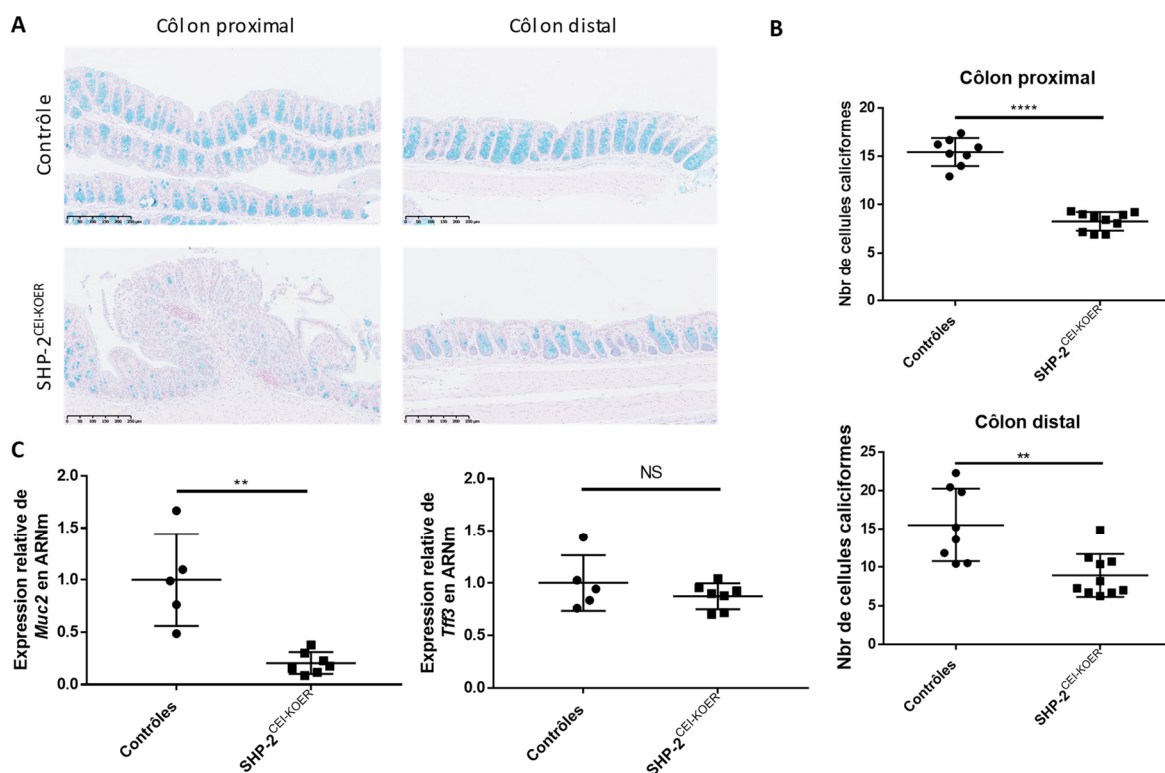
### 1.4. Le nombre de cellules caliciformes est diminué dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ayant développé une inflammation intestinale

Afin de comprendre comment l'inflammation intestinale observée chez les souris expérimentales pouvait se développer, les cellules caliciformes, sécrétant le mucus protecteur, ont été analysées. La figure 5A montre des colorations à l'Alcian bleu de côlons proximaux et distaux de souris contrôles et de souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant 18 jours au tamoxifène, où les cellules caliciformes sont visibles en bleu. Des décomptes cellulaires montrent bien la diminution importante du nombre de cellules Alcian bleu positives par crypte, autant dans le côlon proximal que dans le côlon distal, chez les souris expérimentales (Figure 5B). Des analyses en PCR quantitative en temps réel ont aussi été réalisées sur des échantillons d'enrichissement de muqueuse de côlon proximal. Les gènes *Muc2* et *Tff3* ont été analysés, afin de voir le niveau de différenciation des cellules



**Figure 4 : Les signalisations ERK et STAT3 sont modulées chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> suite à un traitement au tamoxifène de 18 jours.**

Immunobuvardages d'enrichissement de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois et traitées pendant 18 jours au tamoxifène. **A.** Voie de signalisation JAK/STAT, où STAT3 est actif suite à une phosphorylation sur sa tyrosine 705. **B.** Voie de signalisation ERK/MAPK, où MEK est active suite à sa phosphorylation par la kinase RAF sur les sérines 217 et 221 (\*  $p \leq 0.0286$ ).



**Figure 5 : Diminution du nombre de cellules caliciformes et de l'expression de la mucine 2 chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> après traitement de 18 jours au tamoxifène.**

**A.** Coloration à l'Alcian bleu de coupes en paraffine de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois ayant été traitées pendant 18 jours au tamoxifène (barre d'échelle : 250µm). **B.** Décomptes du nombre de cellules caliciformes par crypte réalisés à partir des colorations à l'Alcian bleu sur des coupes de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois, ayant été traitées pendant 18 jours au tamoxifène (\*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ). **C.** PCR quantitative en temps réel de *Muc2* et de *Tff3* réalisées sur des enrichissements de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois ayant été traitées pendant 18 jours au tamoxifène. L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de références *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp* (\*\*  $p \leq 0,01$ )  $N \geq 8$ .

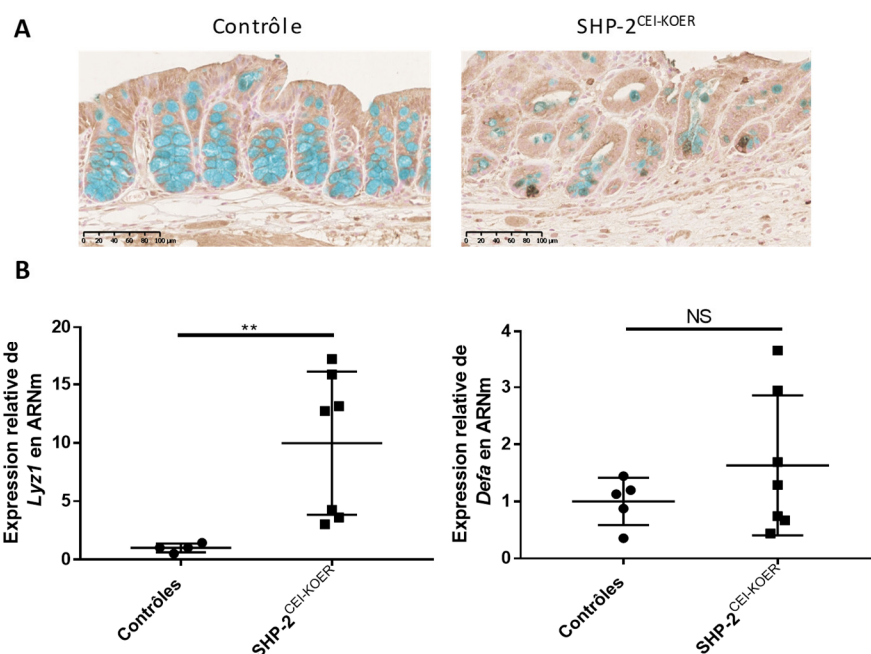
caliciformes. Comme montré sur la figure 5C, l'expression de *Muc2* est significativement diminuée, alors que l'expression de *Tff3* est constante. Pris ensemble, ces résultats montrent que la différenciation ou encore la production de cellules caliciformes est affectée chez les souris expérimentales suite à la perte d'expression de SHP-2.

#### 1.5. Des cellules intermédiaires sont présentes dans le côlon proximal des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> suite à 18 jours de traitement au tamoxifène.

Les cellules caliciformes et les cellules de Paneth proviennent d'une même cellule précurseure (Bjerknes et Cheng, 2010). Afin de voir si la diminution importante du nombre de cellules caliciformes peut être due à un défaut de différenciation de ce précurseur, des immunohistochimies dirigées contre le lysozyme (Paneth), combinées à des colorations à l'Alcian bleu (caliciformes) ont été réalisées sur des lames de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>. Cette façon de faire permet de voir si certaines cellules expriment les deux marqueurs à la fois, signe que celles-ci seraient dans un état de différenciation incomplet. Normalement, aucun marqueur de cellules de Paneth n'est détectable dans l'épithélium colique. Comme le montre la figure 6, des cellules doubles marquées sont présentes dans le côlon proximal des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois et ayant reçu des traitements au tamoxifène pour une durée de 18 jours, double marquage qui est toutefois absent chez les souris contrôles. Pour valider l'expression de marqueurs de cellules de Paneth dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, des analyses de PCR quantitatives en temps réel ont été réalisées. L'expression des gènes *Lyz1* et *Defa* a été analysée sur des extraits d'enrichissement de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et de souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>. Comme le montre la figure 6B, les niveaux d'expression de ces deux gènes sont à la hausse chez les souris expérimentales, la différence n'étant cependant pas significative pour le gène *Defa*. Ces résultats suggèrent la présence de cellules intermédiaires, c'est-à-dire de cellules ayant un statut de différenciation incomplet entre la cellule caliciforme et la cellule de Paneth. La présence de ces cellules dans le côlon suggère un défaut dans la différenciation du précurseur commun en cellules caliciformes (Ouellette, 2011).

#### 1.6. L'expression des gènes nécessaires à la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice de l'épithélium intestinal est affectée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> présentant une inflammation intestinale

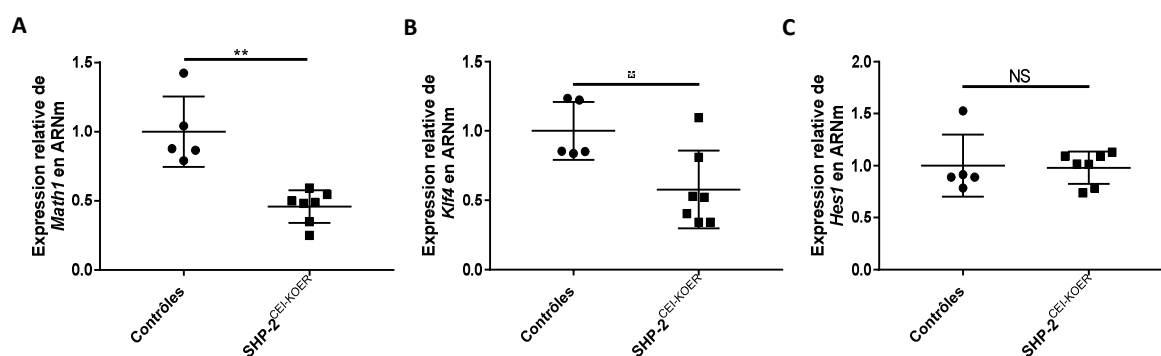
Les souris ayant subi une perte d'expression de SHP-2, à l'âge adulte, dans l'épithélium intestinal, montrent une altération dans la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice de l'épithélium colique, en plus des signes cliniques d'inflammation intestinale. Suite à ces résultats, les



**Figure 6 : Des cellules intermédiaires sont présentes dans le côlon proximal des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>.**

**A.** Les cellules intermédiaires ont été identifiées par double marquage d'une immunohistochimie dirigée contre le lysozyme (marqueur des cellules de Paneth) suivi d'une coloration à l'Alcian bleu (marquage des cellules caliciformes) sur des coupes de côlon proximal de souris contrôles et de souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois et traitées pendant 18 jours au tamoxifène. **B.** Analyse de PCR quantitatif des gènes *Lyz1* et *Defa* sur des extraits d'enrichissement de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois et ayant été traitées pendant 18 jours au tamoxifène (\*\*  $p \leq 0,01$ , NS : non significatif). L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de références *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp*.  $N \geq 5$ .





**Figure 7 : L'expression des gènes nécessaires à la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice de l'épithélium intestinal est affectée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>.**

Analyse de PCR quantitative réalisée sur des échantillons d'enrichissement de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois et ayant été traitées pendant 18 jours au tamoxifène. Les gènes *Math1* (A), *Klf4* (B) et *Hes1* (C) ont été analysés (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , NS : non significatif). L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de références *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp*.  $N \geq 5$ .

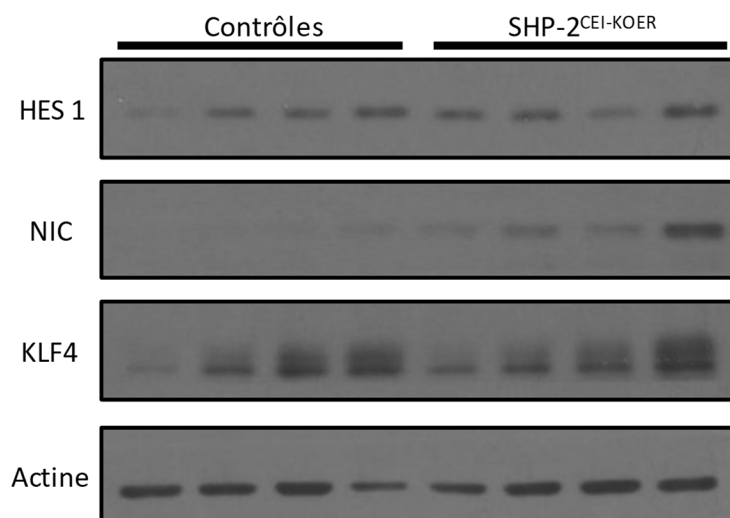
niveaux d'expression de facteurs de transcription associés à la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice ont été analysés en PCR quantitative en temps réel, afin de comprendre comment cette altération de différenciation se produit. Les gènes *Math1*, *Klf4* et *Hes1* ont été analysés sur des échantillons d'enrichissement de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, traitées pendant 18 jours au tamoxifène. Comme montre la figure 7, les gènes *Math1* et *Klf4* montrent une diminution d'expression significative chez les souris expérimentales, KLF4 étant essentiel à la différenciation terminale des cellules caliciformes (Katz *et al.*, 2002). Toutefois, l'expression de *Hes1* n'est pas modulée chez les souris expérimentales, en comparaison avec les souris contrôles. Ces résultats montrent que l'altération de la différenciation ou de la production de cellules caliciformes pourrait être liée à une modulation à la baisse de l'expression de facteurs transcriptionnels importants dans la différenciation de la lignée sécrétrice de l'épithélium intestinal.

#### 1.7. La signalisation cellulaire Notch est peu modulée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> suite à 18 jours de traitement au tamoxifène.

Il est bien connu dans la littérature que la voie Notch inhibe la différenciation des cellules caliciformes de l'épithélium intestinal (Fre *et al.*, 2005). Afin de voir si la perte d'expression de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales permet de moduler l'activité de cette voie, des immunobuvardages d'enrichissement de muqueuse de côlon proximal ont été faits. Pour vérifier le niveau d'activation de la voie, des anticorps contre le fragment intracellulaire de Notch (NIC) et contre HES1 ont été utilisés. *Hes1* est un des gènes cibles de la voie Notch, étant essentiel à la différenciation des cellules absorbantes de l'épithélium intestinal. Comme montré sur la figure 8, l'expression protéique de HES1 n'est pas significativement modulée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> en comparaison avec les souris contrôles. Par contre, la voie Notch en elle-même semble être suractivée, considérant l'augmentation du clivage de Notch (NIC) (\*  $p \leq 0.0268$ ). Ces résultats montrent donc une suractivation possible de la voie Notch, sans toutefois que celle-ci se répercute sur l'expression protéique de HES1.

#### 1.8. Au dixième jour du traitement tamoxifène, les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ne montrent pas de signes cliniques d'inflammation

Afin de déterminer le moment précis où l'inflammation commence à se développer, une cohorte de souris, âgées de trois mois, a été euthanasiée au dixième jour de traitement au tamoxifène, soit le moment où la perte d'expression de SHP-2 à l'épithélium est visible (Figure 1 et 2). À ce moment, aucune perte de poids significative n'est notable chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, en



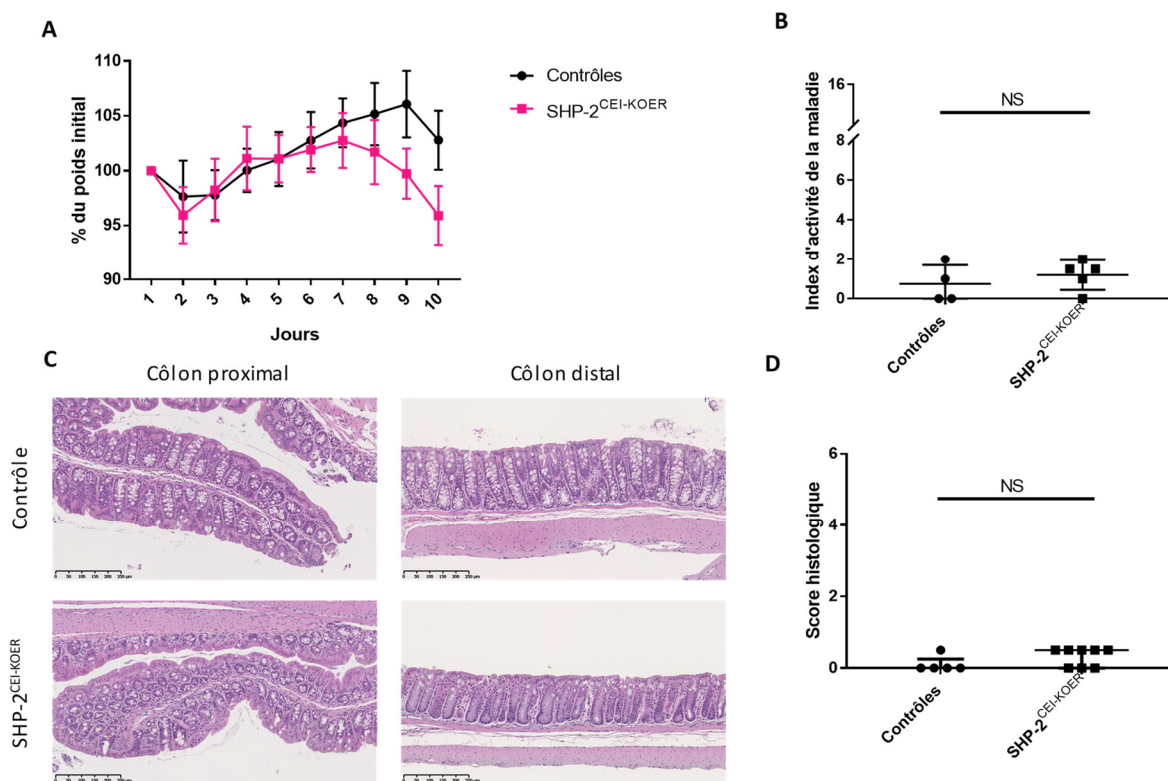
**Figure 8 : La signalisation de Notch semble activée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>.**

Immunobuvardages d'enrichissements de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois ayant reçu un traitement de 18 jours au tamoxifène. Des anticorps dirigés contre HES1, NIC (\*  $p \leq 0.0286$ ) et KLF4 ont été utilisés. L'actine sert de contrôle de dépôt.

comparaison avec les souris contrôles, en réponse aux injections de tamoxifène (Figure 9A). À l'euthanasie, l'index d'activité de la maladie a été calculé et les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ne démontrent pas de signes cliniques associés à l'inflammation intestinale, en comparaison avec les souris contrôles (Figure 9B). L'analyse des coupes histologiques de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, suite à une coloration hématoxyline-éosine (Figure 9C), permet de confirmer l'absence d'inflammation intestinale chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> suite à dix jours de traitement au tamoxifène, comme le montre le graphique de score histologique (Figure 9D). Ces résultats montrent donc que, au dixième jour du traitement au tamoxifène, lorsque la perte d'expression de SHP-2 à l'épithélium est observable, les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> n'ont pas encore développé de signes d'inflammation intestinale, en comparaison avec les souris contrôles. Il s'agit donc d'un bon temps pour identifier des modulations d'expressions ou des modulations dans la signalisation précédant le développement d'inflammation.

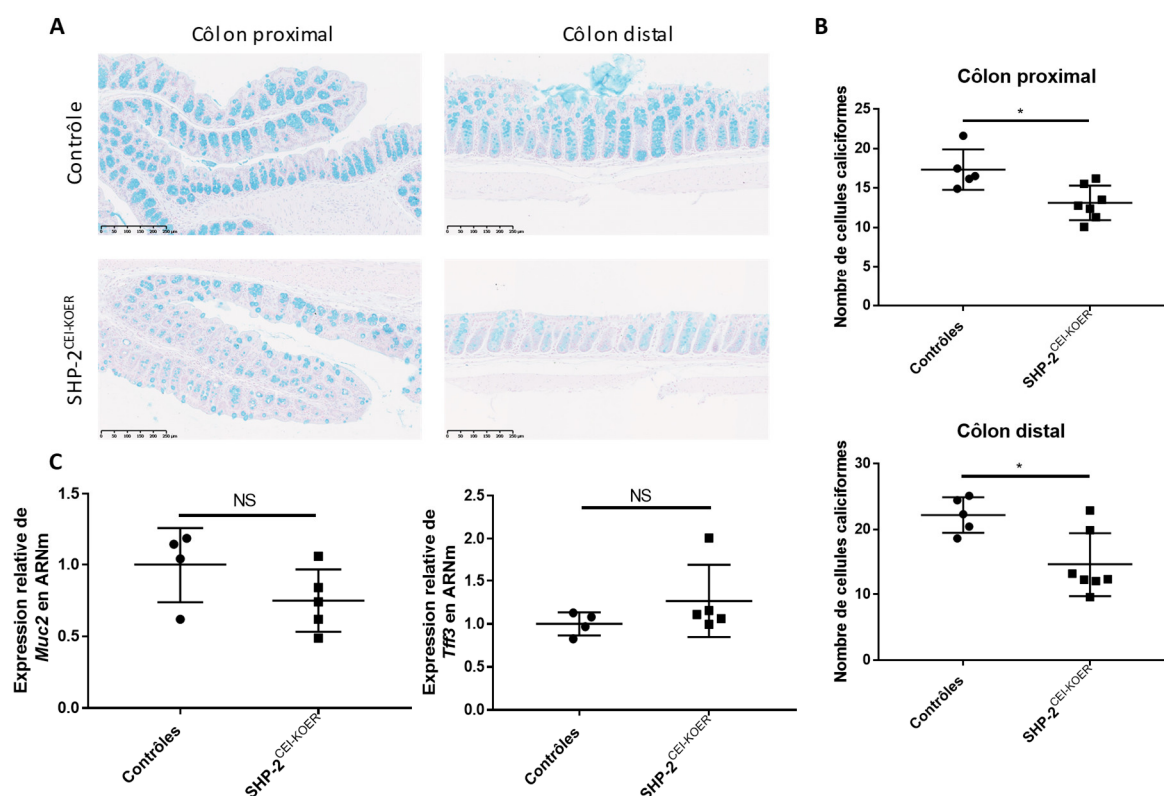
#### 1.9. Le nombre de cellules caliciformes est déjà diminué dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> dix jours seulement après le début des injections de tamoxifène.

Au dix-huitième jour après la première injection de tamoxifène, les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> montrent des signes d'inflammation, en plus d'avoir un nombre de cellules caliciformes diminué, autant dans le côlon proximal que dans le côlon distal, en comparaison avec les souris contrôles. Au contraire, les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, lorsqu'elles ne sont traitées que pendant dix jours au tamoxifène, ne montrent pas de signes cliniques et histologiques d'inflammation intestinale, toujours en comparaison avec les souris contrôles. Les cellules caliciformes de ces souris ont donc été analysées, afin de voir si celles-ci sont altérées avant le développement de l'inflammation intestinale. La figure 10A montre des colorations à l'Alcian bleu réalisées sur des coupes de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, ayant été traitées pendant dix jours au tamoxifène. Suite à un décompte du nombre de cellules caliciformes (Figure 10B), il est possible de voir que ces cellules sont présentes, mais en nombre significativement inférieur chez les souris expérimentales en comparaison aux souris contrôles, autant dans le côlon proximal que dans le côlon distal. Afin de voir l'état des cellules caliciformes, des analyses de PCR quantitative en temps réel ont été réalisées sur des gènes de produits de sécrétions des cellules caliciformes (*Muc2* et *Tff3*). Ces analyses ont été faites sur des échantillons d'enrichissement de muqueuse de souris contrôles et de souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois et traitées pendant dix jours au tamoxifène. Pour ce qui est de *Muc2*, les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> montrent une tendance à la diminution (non significative).



**Figure 9 : Absence d'inflammation chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, dix jours après la première injection de tamoxifène.**

**A.** Courbe de poids des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, traitées pendant dix jours au tamoxifène. **B.** Index d'activité de la maladie des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, au dixième jour de traitement au tamoxifène. **C.** Coloration hématoxyline-éosine de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, traitées pendant 10 jours (barre d'échelle : 250µm). **D.** Score histologique, évalué à l'aide des colorations hématoxyline-éosine, des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, traitées pendant 10 jours au tamoxifène. N ≥ 4.



**Figure 10 : Diminution du nombre de cellules caliciformes et de l'expression de la mucine 2 chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> après traitement de dix jours au tamoxifène.**

**A.** Coloration à l'Alcian bleu de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois ayant été traitées pendant dix jours au tamoxifène (barre d'échelle : 250µm). **B.** Décomptes du nombre de cellules caliciformes réalisés à partir des colorations à l'Alcian bleu sur des coupes de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois, ayant été traitées pendant dix jours au tamoxifène (NS : Non significatif). **C.** PCR quantitative de *Muc2* et de *Tff3* réalisées sur des enrichissements de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois ayant été traitées pendant dix jours au tamoxifène. L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de références *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp* (\*  $p \geq 0,05$ )  $N \geq 4$ .

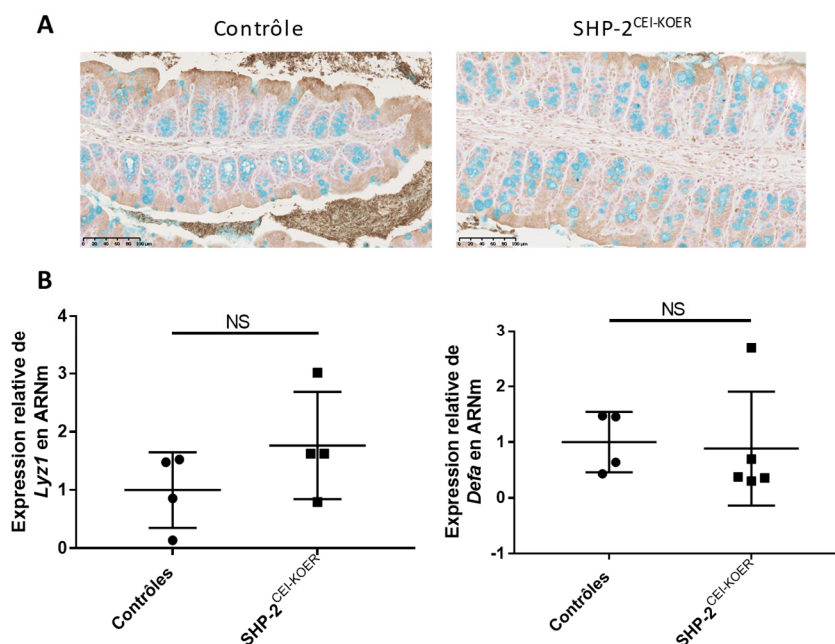
Par contre, dans le cas de *Tff3*, aucune modulation d'expression n'est visible chez les souris expérimentales en comparaison avec les souris contrôles. Ces résultats montrent que, bien que le nombre de cellules marquées à l'Alcian bleu soit rapidement diminué, la non-modulation des transcrits de *Muc2* suggère que leur nombre de cellules caliciformes n'est peut-être pas significativement diminué. La diminution observable de cellules positives Alcian bleu pourrait être due à une hypersécrétion des mucines par les cellules caliciformes.

#### 1.10. Les cellules intermédiaires sont absentes du côlon proximal des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées au tamoxifène pendant dix jours

Au dix-huitième jour de traitement au tamoxifène, la diminution du nombre de cellules caliciformes semble provenir d'une altération du précurseur commun des cellules caliciformes et de Paneth. En effet, cette diminution était associée à l'accumulation de cellules intermédiaires, exprimant à la fois des marqueurs de cellules caliciformes (mucine) et de cellules de Paneth (lysozyme). Comme le nombre de cellules positives à l'Alcian bleu est déjà diminué au dixième jour de traitement au tamoxifène, il était intéressant de vérifier si des cellules intermédiaires peuvent être détectées dans le côlon proximal des souris expérimentales. D'abord, des immunohistochimies contre le lysozyme, suivies d'une coloration à l'Alcian bleu ont été réalisées sur des coupes de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant dix jours au tamoxifène. Comme le montre la figure 11A, nous n'avons pas détecté de cellules doubles marquées dans le côlon proximal des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, après dix jours de traitement. Afin de voir si des marqueurs de cellules de Paneth commencent néanmoins à s'exprimer dans le côlon, sans que ceux-ci soient détectables en immunohistochimie, des analyses de PCR quantitative en temps réel ont été réalisées sur des échantillons d'enrichissement de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois et ayant subi un traitement de dix jours au tamoxifène. Les gènes *Lyz1* et *Defa*, deux gènes de peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules de Paneth, ont été analysés. La figure 11B montre que, sans que cette modulation soit significative, il semble y avoir une tendance à l'augmentation pour ce qui est de l'expression de *Lyz1*, chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>. Ceci suggère que les cellules intermédiaires sont peut-être sur le point d'apparaître chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>.

#### 1.11. La signalisation Notch, associée à la différenciation des cellules caliciformes n'est pas modulée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant 10 jours au tamoxifène

Comme il semble y avoir des perturbations dans la différenciation de la lignée sécrétrice de l'épithélium déjà après dix jours de tamoxifène, chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, l'activation de la voie



**Figure 11 : Absence des cellules intermédiaires chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> après dix jours de traitement au tamoxifène.**

**A.** Double marquage immunohistochimie dirigée contre le lysozyme suivi d'une coloration à l'Alcian bleu, afin de marquer les cellules intermédiaires, sur des coupes de côlon proximal de souris contrôles et de souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois et traitées pendant dix jours au tamoxifène. **B.** Analyse de PCR quantitative des gènes *Lyz1* et *Defa* sur des extraits d'enrichissements de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois et ayant été traitées pendant dix jours au tamoxifène. L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de références *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp* (NS : Non significatif). N ≥ 4.



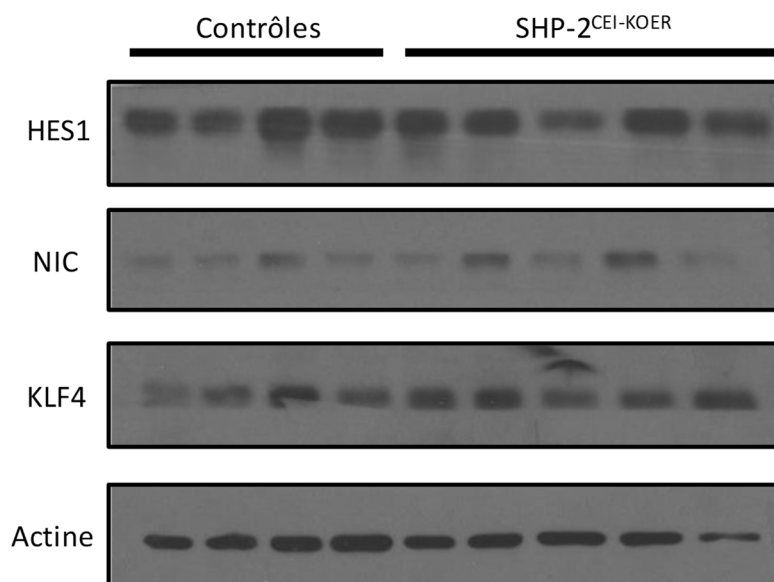
Notch a été analysée. Par immunobuvardage d'enrichissements de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, l'expression de NIC et de HES1 a été vérifiée afin de connaître le statut d'activation de la voie. Comme le montre la figure 12, de la même façon que lors d'un traitement de 18 jours au tamoxifène, l'expression de HES1 est plutôt stable entre les souris contrôles et expérimentales. Par contre, au contraire des souris présentant des signes cliniques d'inflammation, l'expression de NIC, chez les souris expérimentales traitées dix jours ne semble pas augmentée. Ces résultats montrent que la diminution rapide du nombre de cellules Alcian bleu positives suite à la perte d'expression de SHP-2 pourrait être indépendante de la voie Notch. En fait, à ce moment, comme il a été mentionné plus haut, il pourrait s'agir d'hypersécrétion, comme les transcrits des produits de sécrétion des cellules caliciformes ne sont pas significativement modulés. Les mucines n'ayant pas le temps de s'accumuler dans le cytoplasme, les cellules caliciformes sont plus difficilement détectables en coloration Alcian bleu.

#### 1.12. La signalisation cellulaire régulée par SHP-2 semble peu affectée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant 10 jours au tamoxifène.

Chez les souris expérimentales traitées au tamoxifène pendant 18 jours, la signalisation cellulaire régulée par SHP-2 est altérée tel qu'attendu, comme le montre la figure 4. Afin de vérifier si cette altération de la signalisation cellulaire précède le début de l'inflammation intestinale, absente à dix jours de traitements au tamoxifène, des immunobuvardages d'enrichissements de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et de souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, traitées au tamoxifène pendant 10 jours, ont été réalisés. La figure 13 montre des immunobuvardages de pSTAT3 (Tyr 705) et de pMEK (Ser 217/221). Dans les deux cas, la signalisation semble peu modulée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> en comparaison avec les souris contrôles, bien qu'une légère augmentation de la tyrosine 705 de STAT3 soit déjà visible. Ainsi, ceci suggère que les signalisations MEK/ERK et STAT3 régulées par SHP-2 sont peu altérées avant le début de l'apparition de l'inflammation intestinale.

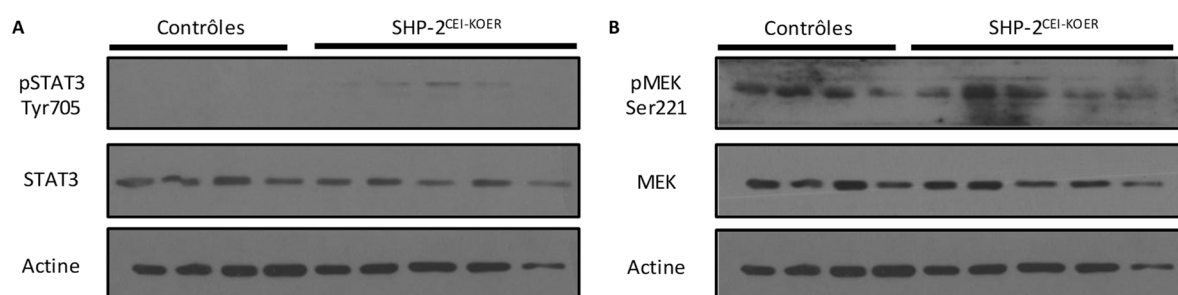
#### 1.13. Les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant 12 jours au tamoxifène montrent déjà des signes d'inflammation intestinale.

À 18 jours de traitement au tamoxifène, les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> montrent divers signes d'inflammation, autant cliniques qu'histologiques. Par contre, à dix jours de traitement, lorsque l'inhibition d'expression de SHP-2 est visible à l'épithélium, les souris SHP-2 ne montrent pas encore de signes d'inflammation intestinale. Il était donc intéressant de déterminer à quel moment les



**Figure 12: L'expression de HES1, de NIC et de KLF4 n'est pas significativement altérée chez les souris traitées au tamoxifène pendant dix jours.**

Immunobuvardages sur des lysats d'enrichissements de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant dix jours. L'actine est utilisée comme contrôle de dépôt.



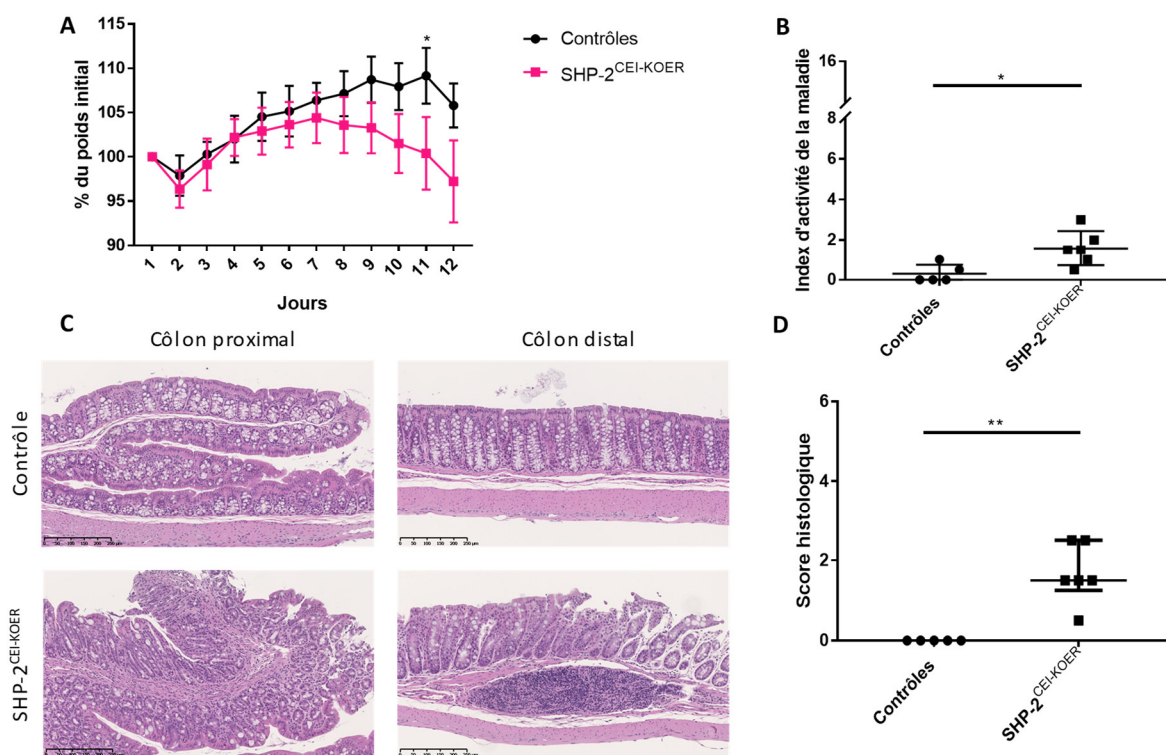
**Figure 13: Le niveau d'activation de STAT3 et de MEK est peu affecté chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> suite à un traitement au tamoxifène de dix jours.**

Immunobuvardages d'enrichissements de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois et traitées pendant dix jours au tamoxifène. **A.** Voie de signalisation JAK/STAT, où STAT3 est actif suite à une phosphorylation sur sa tyrosine 705. **B.** Voie de signalisation ERK/MAPK, où la voie est active suite à la cascade de phosphorylation impliquant la phosphorylation de la kinase MEK.

signes cliniques d'inflammation se manifestent, suite aux injections de tamoxifène et donc, suite à l'inhibition de l'expression de SHP-2 dans l'épithélium intestinal. Afin d'établir la chronologie des événements, une cohorte de souris a été euthanasiée à 12 jours suivant la première injection de tamoxifène. Comme le montre la figure 14A, les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> commencent à montrer une perte de poids significative suite aux injections de tamoxifène, à 11 jours, en comparaison avec les souris contrôles. Pour ce qui est des signes cliniques d'inflammation, montrés par l'index d'activité de la maladie (Figure 14B), ceux-ci ne sont pas significativement différents, à 12 jours. Par contre, l'épithélium des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> montre déjà des signes d'inflammation comme montrés par le score histologique (Figure 14C et D). En résumé, cette cohorte de souris a permis de déterminer que l'inhibition d'expression de SHP-2 à l'épithélium intestinal entraîne, dès 12 jours, une altération de l'épithélium, sans toutefois que ces dommages induisent de signes cliniques d'inflammation visibles macroscopiquement.

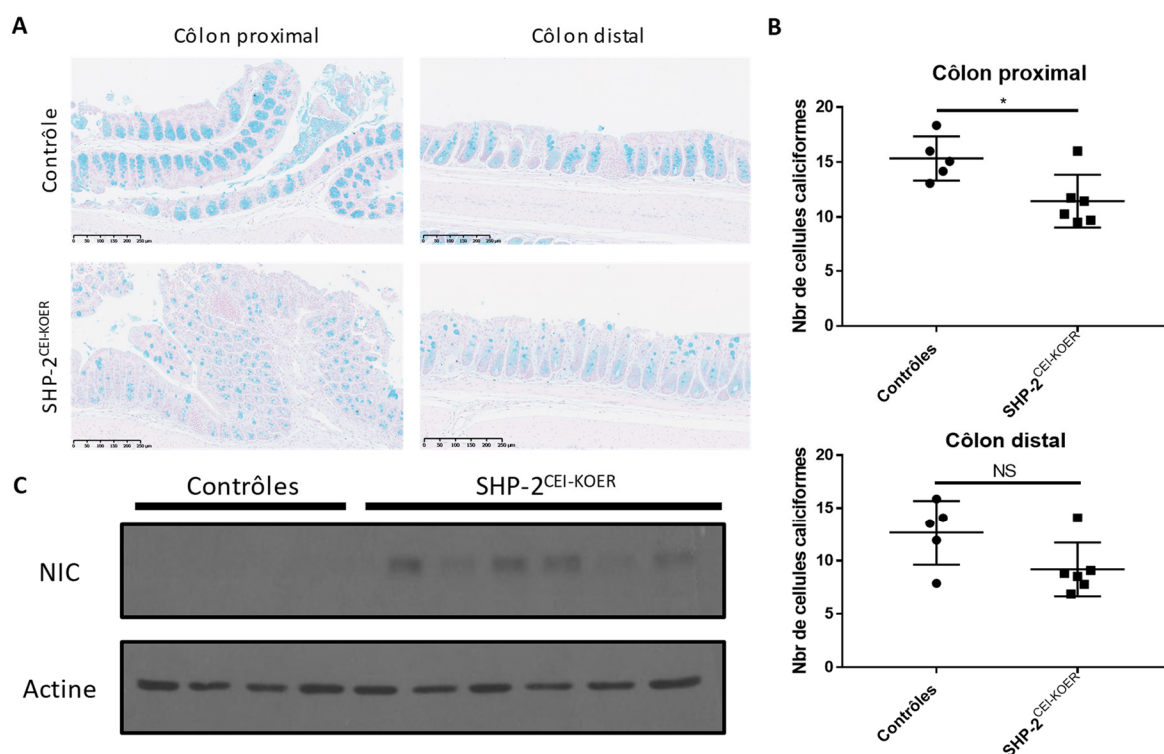
#### 1.14. L'activation de la voie Notch accompagne la diminution du nombre de cellules positives à l'Alcian bleu à 12 jours de traitement tamoxifène

Les souris ayant été traitées pendant 12 jours au tamoxifène présentent des altérations dans la structure de leur épithélium intestinal, sans toutefois montrer de signes cliniques d'inflammation intestinale. À 10 jours de traitement, les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> montrent une diminution significative du nombre de cellules positives à l'Alcian bleu dans le côlon, sans toutefois qu'une modulation de l'activation de la voie Notch soit observable. Ces paramètres ont été aussi analysés chez les souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois et ayant été traitées pendant 12 jours au tamoxifène. La figure 15A et B montre que, comme après 10 jours de traitement au tamoxifène, la diminution du nombre de cellules positives à l'Alcian bleu dans le côlon est présente. Contrairement à ce qui se produit chez les souris traitées pendant 10 jours, la figure 15C montre que, chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, la voie Notch est suractivée (\*\*  $p \leq 0.0095$ ), en comparaison avec les souris contrôles. Afin de confirmer qu'il y a bel et bien activation de la voie Notch à ce moment, des analyses complémentaires, notamment en PCR quantitative en temps réel, devront être faites. Le petit nombre d'individus ainsi que la trop grande variabilité inter individus ne permettent pas de réaliser ces analyses à l'heure actuelle. Ces résultats montrent néanmoins que la diminution du nombre de cellules positives à l'Alcian bleu dans le côlon, associée à une suractivation de la voie Notch, précède le développement des signes cliniques d'inflammation.



**Figure 14: Les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> montrent des signes d'inflammation dès 12 jours de traitement au tamoxifène.**

**A.** Courbe de poids des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, traitées pendant 12 jours au tamoxifène (\*  $P \leq 0.05$ ). **B.** Index d'activité de la maladie des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, au 12<sup>e</sup> jour de traitement au tamoxifène (\*  $P \leq 0.05$ ). **C.** Coloration hématoxyline-éosine de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, traitées pendant 12 jours (barre d'échelle : 250 $\mu$ m). **D.** Score histologique, évalué à l'aide des colorations hématoxyline-éosine, des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, traitées pendant 12 jours au tamoxifène (\*\*  $P \leq 0.01$ ).  $N \geq 4$ .



**Figure 15: La diminution du nombre de cellules positives à l'Alcian bleu dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> est associée à une suractivation de la voie Notch, à 12 jours de traitement au tamoxifène.**

**A.** Coloration à l'Alcian bleu de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois ayant été traitées pendant 12 jours au tamoxifène (barre d'échelle : 250µm). **B.** Décomptes du nombre de cellules caliciformes réalisés à partir des colorations à l'Alcian bleu sur des coupes de côlon proximal et de côlon distal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois, ayant été traitées pendant 12 jours au tamoxifène (\*  $P \leq 0,05$ , NS : non-significatif). **C.** Immunobuvardages d'extraits d'enrichissements de muqueuse de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> âgées de trois mois ayant été traitées pendant 12 jours (\*\*  $p \leq 0.0095$ ). L'actine est utilisée comme contrôle de dépôt.  $N \geq 4$ .

## 2. Modèle de lignée cellulaire

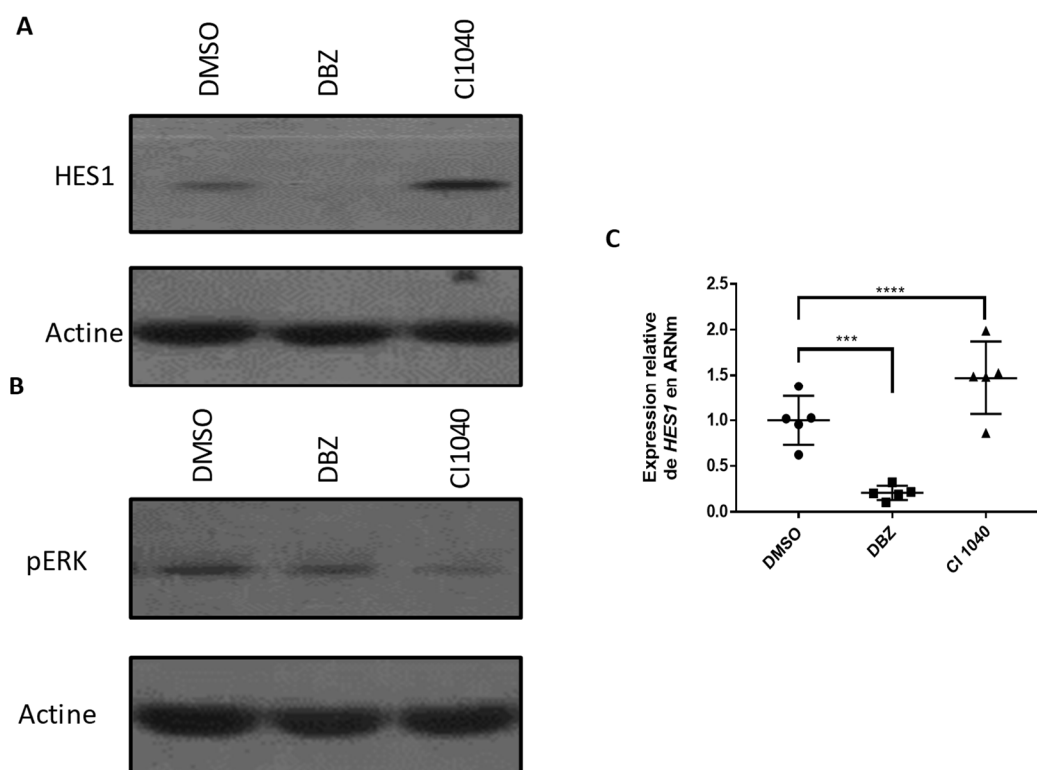
### 2.1. La lignée cellulaire LS174T répond bien aux inhibiteurs de la $\gamma$ -sécrétase et de MEK et l'inhibition de la voie ERK/MAPK semble avoir un effet activateur sur la voie Notch.

Afin de valider la capacité des inhibiteurs sélectionnés (DBZ et CI-1040) à bien inhiber leur cible dans notre modèle cellulaire, des immunobuvardages et des analyses de PCR quantitative en temps réel ont été réalisés. Ces inhibiteurs permettent l'inhibition de la  $\gamma$ -sécrétase et de MEK, respectivement. Les analyses ont été faites sur des lysats de cellules LS174T traitées pendant 96h avec du DMSO (contrôle), le DBZ et le CI-1040. D'abord, en immunobuvardage, HES1 et pERK ont été analysés, pour vérifier l'inhibition respective de la voie Notch et ERK/MAPK (Figure 16A et B). Pour ce qui est de HES1, la condition traitée au DBZ montre une forte perte d'expression, ce qui témoigne d'une inhibition complète de l'activation de la voie Notch, donc d'un bon fonctionnement de l'inhibiteur. Dans le cas de pERK, la condition traitée avec le CI-1040, l'inhibiteur de MEK, montre une diminution de phosphorylation, ce qui était attendu, sans avoir d'effet sur la forme totale de ERK (résultat non montré). Pour bien confirmer l'inhibition de la voie Notch par le DBZ, une analyse de PCR quantitative en temps réel a été faite pour le gène *HES1*. Comme le montre la figure 16C, l'expression de *HES1* est fortement diminuée lorsque les cellules sont traitées avec le DBZ.

En plus d'avoir permis de vérifier l'action des inhibiteurs, les immunobuvardages ont permis de voir que l'inhibition de la voie ERK/MAPK, par le CI-1040, semble avoir un effet activateur sur la voie Notch. Comme le montre la figure 16A, pour la condition traitée avec le CI-1040, l'expression de HES1 est plus forte que pour la condition contrôle, ce qui témoigne d'une activation plus importante de la voie Notch lors d'une inhibition de la voie ERK/MAPK. Ce résultat a été confirmé en PCR quantitative en temps réel, où, encore une fois, l'expression de *HES1* est significativement plus élevée dans la condition traitée avec le CI-1040 que dans la condition contrôle. Ces résultats ont permis de mettre en lumière un potentiel rôle inhibiteur de la voie ERK/MAPK sur la voie Notch.

### 2.2. L'inhibition des voies Notch et ERK/MAPK dans les cellules LS174T module l'expression des gènes associés aux cellules de la lignée sécrétrice de l'épithélium intestinal

Comme les cellules LS174T ont la capacité de se différencier en cellules caliciformes, elles ont été utilisées afin de vérifier l'expression des différents gènes associés aux cellules caliciformes, suite à l'inhibition de la voie ERK/MAPK. Des analyses de PCR quantitative en temps réel ont été faites pour les gènes *MUC2*, *TFF3* et *KLF4*. Comme le montre la figure 17, l'inhibition de la voie Notch par le DBZ amène une augmentation de l'expression de ces trois gènes. En ce qui concerne l'inhibition



**Figure 16: Validation de l'effet des inhibiteurs dans les cellules LS174T.**

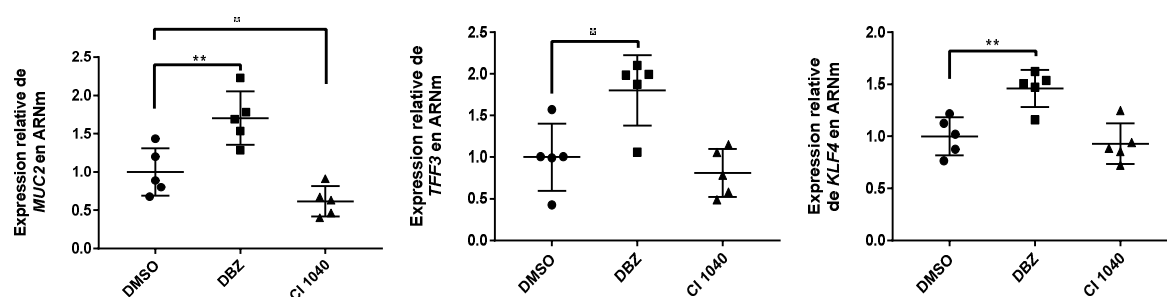
Lysats cellulaires de LS174T traitées pendant 96h avec un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase (DBZ, 1 $\mu$ M) et un inhibiteur de MEK (CI-1040, 2  $\mu$ M). **A.** Immunobuvardages de lysats de HES1, pour évaluer l'activité de la voie Notch. **B.** Immunobuvardages de ERK phosphorylé (pERK) pour évaluer l'activité de la voie ERK/MAPK. L'actine sert de contrôle de dépôt. **C.** Analyse par PCR quantitative en temps réel réalisée sur des lysats cellulaires de LS174T traitées pendant 96h avec DBZ ou CI-1040 pour l'expression de *HES1*. L'expression relative de ce gène a été normalisée sur les gènes de références *RPL13A*, *MRPL19* et *PUM1* (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ).  $N \geq 5$ .



de la voie ERK/MAPK, l'effet inverse est observé, alors que *MUC2* et *TFF3* montrent une diminution d'expression pour la condition traitée au CI-1040, en comparaison avec la condition contrôle. L'effet inhibiteur de la voie ERK/MAPK sur la voie Notch semble donc se transposer sur l'expression des gènes de cellules caliciformes. Par contre, dans le cas de *KLF4*, qui est un facteur de transcription essentiel à la différenciation terminale des cellules caliciformes (Katz J et al, 2002), l'inhibition de la voie ERK/MAPK n'est pas en mesure de moduler son expression à la baisse. Ces résultats montrent donc un rôle potentiel de la voie ERK/MAPK dans la modulation de la différenciation des cellules caliciformes, en plus de celui déjà connu de la voie Notch.

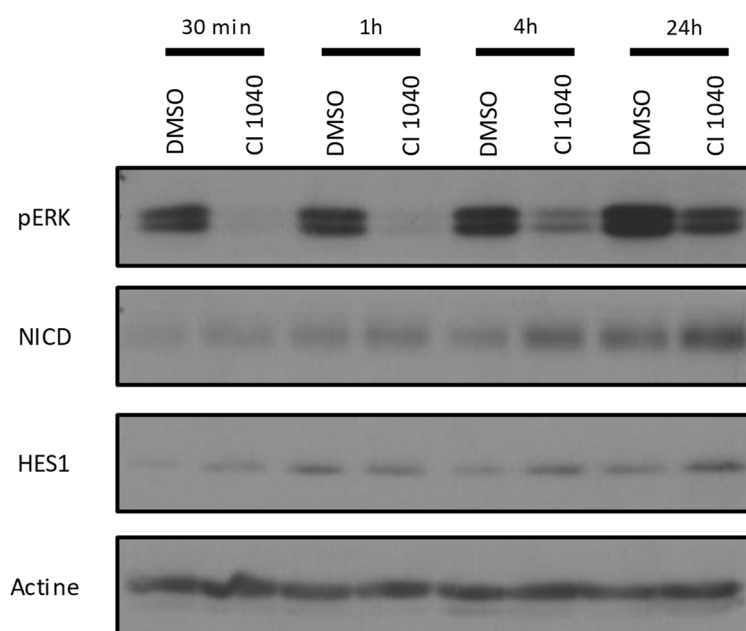
### 2.3. L'inhibition de la voie ERK/MAPK active rapidement la voie Notch

Afin de comprendre comment la voie ERK/MAPK peut moduler la voie Notch, des essais ont été réalisés afin de voir la vitesse à laquelle l'activation de celle-ci a lieu. Des cellules LS174T ont donc été traitées avec le CI-1040 sur de courtes périodes, soit pendant 30 min, 1h, 4h et 24h, le dernier temps servant de contrôle d'activation positif. Comme le montre la figure 18, l'inhibition de la phosphorylation de ERK par le CI-1040 est visible dès 30 min. L'activation de la voie Notch, traduite par une augmentation de l'expression de NIC, semble être plus élevée dès 1h après l'ajout de CI-1040, avec une augmentation plus visible à 4h. Quant à l'expression de HES1, un gène cible de Notch, celle-ci n'est pas modulée, compte tenu des temps de traitements trop courts. Ces résultats préliminaires montrent donc une capacité de la voie ERK/MAPK à moduler, et ce, de façon assez rapide, le clivage de Notch.



**Figure 17: L'inhibition de la voie ERK/MAPK diminue l'expression de la mucine 2 dans les LS174T.**

Analyses par PCR quantitatives réalisées sur des lysats cellulaires de LS174T traitées pendant 96h avec le DBZ (1 $\mu$ M), pour inhiber la voie Notch, et le CI-1040 (2 $\mu$ M), pour inhiber la voie ERK/MAPK. Les gènes *MUC2*, *TFF3* et *KLF4* ont été analysés. L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de références *RPL13A*, *MRPL19* et *PUM1* (\*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , NS : non significatif).  $N \geq 5$ .



**Figure 18: Activation rapide de la voie Notch suite à l'inhibition de la voie ERK/MAPK.**

Immunobuvardages de pERK, NIC et HES1 sur des lysats cellulaires de LS174T traitées pendant 30 min, 1h, 4h et 24h au DMSO ou au CI-1040 2  $\mu$ M. L'actine sert de contrôle de dépôt. N=3

## DISCUSSION

De par la régulation directe de plusieurs voies de signalisation, SHP-2 est connue pour contrôler plusieurs processus importants dans la cellule. Des travaux précédents dans notre laboratoire ont d'ailleurs montré que la perte d'expression embryonnaire de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales altérait la différenciation cellulaire dans l'épithélium intestinal après la naissance, perturbant grandement l'homéostasie du côlon (Coulombe *et al.*, 2013 ; Coulombe *et al.*, 2016). Notre nouveau modèle de délétion inductible de l'expression de SHP-2 chez l'adulte a permis de confirmer ce rôle important joué par SHP-2 dans le maintien de l'homéostasie colique et de mieux comprendre les événements de signalisation et cellulaires subséquents à sa délétion. De plus, l'utilisation d'une lignée cellulaire de côlon capable d'exprimer des marqueurs de différenciation typiques des cellules caliciformes a permis de dévoiler certains des mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la régulation de cette différenciation par SHP-2.

### 1. Impact de la délétion de SHP-2 dans les CEIs au stade embryonnaire en comparaison avec la délétion chez l'adulte

Il a été montré que les souris ayant subi la perte d'expression de SHP-2 spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales, au stade embryonnaire, développent rapidement une inflammation colique sévère quatre semaines après la naissance (Coulombe *et al.*, 2013 ; Yamashita *et al.*, 2014). Associées à cette inflammation, l'architecture de l'épithélium colique ainsi que la différenciation des différents types cellulaires épithéliaux sont affectées (Coulombe *et al.*, 2013 ; Yamashita *et al.*, 2014 ; Heuberger *et al.*, 2014). Comme la délétion embryonnaire se produit au jour 12.5 du développement embryonnaire (Marjou *et al.*, 2004), il reste possible que les effets de la perte d'expression de SHP-2 soient attribuables à un défaut dans le développement de l'intestin avant la naissance et durant sa maturation après la naissance.

L'apparition des symptômes typiques des MII peut survenir chez des patients de tous âges; néanmoins, les symptômes se développent plus rapidement chez les jeunes adultes (Xavier et Podolsky, 2007), surtout dans les cas de la maladie de Crohn (Ruel *et al.*, 2014). De plus, la présentation et le développement de la maladie ne sont pas les mêmes, selon que la maladie se développe chez un enfant ou chez une personne plus âgée. En effet, dans les « elderly-onset IBD », l'inflammation qui se développe chez les personnes âgées de 60 ans et plus est moins sévère et plus facile à traiter (Ha et Katz, 2013). Cette inflammation ne requiert généralement que très peu de

médications agressives (stéroïdes, anti-TNF- $\alpha$ ) et est moins sujette à dégénérer et à mener à des complications nécessitant une chirurgie (Ha et Katz, 2013). La progression de l'inflammation est aussi moins rapide et moins extensive suite au diagnostic (Ruel *et al.*, 2014). Au contraire, dans les « early-onset IBD », l'inflammation se développant chez de très jeunes patients est beaucoup plus agressive (Ruel *et al.*, 2014). Donc, généralement, plus la maladie se développe tôt, plus les symptômes sont agressifs, comme dans le cas des « very-early-onset IBD », où les symptômes peuvent se développer aussi tôt que dans la première année de vie (Shim et Seo, 2014). Dans ces cas, des mutations dans les gènes impliqués dans la signalisation de l'interleukine 10 (IL-10) sont souvent retrouvées (Shim et Seo, 2014). En plus d'avoir des symptômes d'intensité différente, les maladies diagnostiquées à des âges différents semblent aussi avoir des causes différentes. Par exemple, la composante génétique semble plus fortement impliquée dans les cas de diagnostic plus précoce (Ruel *et al.*, 2014).

Ces informations ont rendu pertinente l'exploration de l'effet d'une inhibition d'expression de SHP-2 dans l'épithélium intestinal des souris adultes. Ce nouveau modèle permet de voir si le développement des symptômes est aussi rapide et si l'inflammation est aussi sévère quand l'inactivation de SHP-2 se produit lorsque le développement intestinal de la souris est complété et que la microflore intestinale est bien établie. Pour ce faire, des cohortes de souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ont été générées et ont été maintenues en conditions normales (eau et nourriture à volonté) jusqu'à l'âge de trois mois. À trois mois, les souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ont reçu des injections intrapéritonéales de tamoxifène (Schéma 7), afin d'activer la Cre recombinase et d'obtenir la perte d'expression de SHP-2 dans les cellules épithéliales intestinales spécifiquement (Schéma 6).

D'abord, la perte d'expression de SHP-2 a été validée par immunohistochimie, confirmant ainsi que la perte d'expression se limitait bien à l'épithélium intestinal (Figure 1). La perte d'expression n'est pas encore présente au jour 6 post-injection, mais elle est bien visible aux jours 10, 12 et 18 post-injections (Figure 2). Aucune altération du phénotype intestinal n'est cependant observable chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant six jours au tamoxifène. Le tamoxifène n'a donc aucun effet en soit sur l'épithélium intestinal, autant chez les souris contrôles qu'expérimentales.

Originellement, les injections au tamoxifène devaient se faire selon le schéma suivant : cinq injections, neuf jours de repos, cinq injections, euthanasie. Ce schéma tenait compte du temps pour obtenir l'inhibition de SHP-2 et du temps pour développer l'inflammation intestinale. Cependant, dans la première cohorte ayant été traitée de cette façon, plusieurs souris sont décédées avant la fin

du traitement d'une colite très sévère (résultats non montrés). La cohorte suivante a donc été suivie de plus près et l'euthanasie a dû se faire au jour 18 post-injections, puisque certaines souris expérimentales étaient en voie d'atteindre le point limite de perte de poids, fixé à 20% du poids corporel perdu (Figure 3A). Ce schéma a donc été conservé pour la suite des expériences. En plus de la perte de poids, d'autres signes cliniques étaient visibles au cours des traitements, chez les souris expérimentales. Par exemple, certains individus présentaient de la diarrhée et de légers saignements à l'anus. Ces symptômes ont toujours été indépendants du sexe des souris.

À l'euthanasie, les souris expérimentales ont montré un index d'activité de la maladie (DAI) significativement plus élevé que les souris contrôles ayant été traitées de la même façon (Figure 3B). Bien que de prime abord, l'intensité du DAI chez le modèle adulte semble plus faible que chez le modèle embryonnaire (Coulombe *et al.*, 2013), nous ne pouvons établir de comparaison directe, puisque les souris ne proviennent pas des mêmes cohortes et n'ont probablement pas été élevées dans les mêmes conditions. Néanmoins, les signes cliniques observés chez ces deux modèles sont très semblables.

Afin de mieux caractériser cette inflammation qui semblait présente chez les souris expérimentales adultes, un score histologique a été aussi calculé à partir de coupes histologiques, colorées à l'hématoxyline-éosine, de côlon de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant 18 jours au tamoxifène. Ce score histologique a permis de déterminer le degré de l'atteinte inflammatoire à l'épithélium intestinal. Suite aux injections de tamoxifène, les souris contrôles ne montrent aucun signe d'atteinte inflammatoire à l'épithélium, ce qui, une fois de plus, valide l'innocuité du tamoxifène. Au contraire, les souris expérimentales montrent plusieurs signes d'une atteinte inflammatoire, notamment une érosion de l'épithélium de surface et une infiltration de cellules immunitaires dans le tissu (Figure 3C et D). Encore une fois, ce résultat est comparable au phénotype observé chez les souris expérimentales du modèle embryonnaire, un mois après la naissance (Coulombe *et al.*, 2013).

Le phénotype inflammatoire est donc similaire, que la perte d'expression de SHP-2 se fasse au stade embryonnaire ou à l'âge adulte, mais qu'en est-il des mécanismes pouvant jouer un rôle dans le développement de cette inflammation? Dans le modèle de délétion embryonnaire, la perte d'expression de SHP-2 mène rapidement à une diminution de l'activation de la voie de signalisation ERK/MAPK et à une augmentation de l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT3 dans l'épithélium des souriceaux (Coulombe *et al.*, 2013 ; Heuberger *et al.*, 2014 ; You *et al.*, 1999). Ces

modifications de la signalisation cellulaire sont présentes à un mois après la naissance, mais aussi à trois et quinze jours après la naissance, donc avant l'apparition des premiers signes cliniques d'inflammation colique (Coulombe *et al.*, 2013). Ces voies de signalisation ont aussi été analysées chez le modèle adulte, chez les souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, âgées de trois mois, ayant reçu des injections de tamoxifène sur une période de 18 jours. Encore une fois, les changements dans la signalisation observés dans l'épithélium des souris adultes présentant une inflammation intestinale sont similaires à ceux observés dans l'épithélium des souris ayant subi la perte d'expression au stade embryonnaire (Figure 4). En effet, chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, la phosphorylation sur la tyrosine 705 de STAT3 est plus forte, en comparaison aux souris contrôles, suggérant donc une suractivation de ce facteur de transcription, dû à la perte du rétrocontrôle négatif normalement exercé par SHP-2 sur JAK2 et/ou STAT3 (Xu et Qu, 2008.) Comme mentionné précédemment, la voie de signalisation JAK/STAT est, entre autres, activée par des cytokines comme l'IL-6 (Rawlings *et al.*, 2004) et cette voie de signalisation est aussi connue pour être grandement stimulée lors de l'inflammation intestinale. En effet, il a été rapporté dans la littérature que les niveaux de phosphorylation de STAT3 et d'IL-6 sont plus élevés dans la muqueuse de patients atteints de colite ulcéreuse ou de maladie de Crohn (Mudter *et al.*, 2005 ; Musso *et al.*, 2005 ; Murano *et al.*, 2014). Cette activation de STAT3 est retrouvée tant dans les cellules épithéliales que dans les cellules immunitaires (Mudter *et al.*, 2005). Plus intéressant encore, il a été démontré grâce à des modèles murins de délétion conditionnelle de STAT3 dans les cellules épithéliales et les cellules immunitaires que l'activation de STAT3 dans l'épithélium jouait plutôt un rôle anti-inflammatoire alors que l'activation de STAT3 dans les cellules immunes était pro-inflammatoire (Li *et al.*, 2012 ; Mudter *et al.*, 2005). Ainsi, nos résultats suggèrent que l'activation épithéliale de STAT3 survenant suite à la délétion de SHP-2 ne serait pas suffisante pour empêcher le développement de l'inflammation, du moins dans le côlon. Cela dit, il est possible que l'hyperactivation épithéliale de STAT3 soit suffisante par contre pour protéger l'épithélium de l'intestin grêle de l'inflammation (Coulombe *et al.*, 2013).

Toujours chez les souris expérimentales, la kinase MEK1 montre une diminution de phosphorylation sur ses sérines 217 et 221, diminution se traduisant possiblement par une activation moindre des kinases ERK1/2. Cette baisse d'activation de la voie ERK/MAPK pourrait être responsable d'une différenciation aberrante du précurseur des cellules caliciformes/de Paneth et donc ainsi contribuer au développement de l'inflammation (Heuberger *et al.*, 2014 ; Coulombe *et al.*, 2016). En effet, une diminution du nombre de cellules caliciformes ainsi qu'une expression anormale de

peptides antimicrobiens dans le côlon sont deux facteurs pouvant contribuer au développement d'inflammation intestinale (Van der Sluis *et al.*, 2006 ; Kim and Ho, 2010)

En lien avec la présence aberrante de peptides antimicrobiens dans le côlon des souris expérimentales, les travaux précédents avec le modèle de délétion embryonnaire avaient aussi montré que le déclenchement d'inflammation colique chez la souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> était associé à l'activation aberrante de certains récepteurs « Toll-like » (TLR), responsables de la reconnaissance des bactéries à la surface des cellules épithéliales. En effet, la délétion concomitante de MYD88 dans l'épithélium intestinal des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> atténue grandement la sévérité de la colite (Coulombe *et al.*, 2016). De plus, le traitement des souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup> avec des antibiotiques réduit aussi fortement l'inflammation colique (Coulombe *et al.*, 2013). Ainsi, la flore intestinale joue un rôle dans le déclenchement de l'inflammation chez la souris déficiente pour l'expression de SHP-2.

De manière intéressante, la composition de la flore intestinale est modulée dans le modèle de délétion embryonnaire (Coulombe *et al.*, 2016). En effet suite à une analyse de séquençage de l'ARN ribosomal 16S à partir des fèces se trouvant dans le cæcum, des altérations importantes dans la diversité et dans le nombre de bactéries ont été observées chez les souris expérimentales. Plus précisément, une abondance relative plus élevée des phyla Proteobacteria et Bacteroidetes et une diminution de l'abondance relative du phylum Firmicutes ont été notées (Coulombe *et al.*, 2016). De manière remarquable, des changements similaires dans les ratios de ces phyla sont aussi observés chez les patients souffrant de MII (Dupont et Dupont, 2011). Chez les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, ces changements sont visibles dès deux semaines après la naissance, avant l'apparition des signes d'inflammation colique. Une explication sur l'origine de cette dysbiose pourrait être l'expression aberrante de peptides antimicrobiens que nous avons observée dans le côlon proximal des souris expérimentales. En effet, dans ce modèle, *Lyz1*, et *Defa* sont des gènes de peptides antimicrobiens généralement associés aux cellules de Paneth de l'intestin grêle qui sont surexprimés de façon impressionnante dans le côlon dès trois jours après la naissance (Coulombe *et al.*, 2016). Leur présence aberrante peut donc façonner l'établissement de la flore après la naissance, changeant les ratios des principaux groupes bactériens pour favoriser ceux associés à un phénotype inflammatoire.

Comme il s'agit d'un modèle de délétion embryonnaire, il est probable que des défauts de développement déjà présents à la naissance soient responsables de l'établissement anormal de la flore, amenant les modulations observées. Afin d'éliminer cette possibilité, la composition de la flore des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant 18 jours au tamoxifène a été aussi analysée



(résultats préliminaires, Annexes 1 et 2). Comme la délétion a lieu à l'âge de trois mois, lorsque les souris ont atteint l'âge adulte, l'établissement de la flore à la naissance s'est donc déroulé de manière similaire entre les souris contrôles et expérimentales (non traitées au tamoxifène). De façon remarquable cependant, des modulations importantes dans les phyla Firmicutes et Bacteroidetes sont observables 18 jours après la première injection de tamoxifène, modifications similaires à ce qui est observable chez le modèle de délétion embryonnaire, à 1 mois (Annexe 1 et Coulombe *et al.*, 2016). En plus des modifications dans ces phyla, une augmentation du nombre de Verrucomicrobiae est aussi observée (Annexe 1).

Compte tenu du nombre limité de souris analysées (n=4 par groupe) et de la variabilité inter individus qui est quand même présente, les cæcums d'autres souris devront être analysés pour vraiment valider statistiquement toutes nos observations. Néanmoins, les changements observés dans le ratio Firmicutes/Bacteroidetes sont vraiment intéressants et en accord avec ce qui est généralement observé lors de l'inflammation intestinale tant chez d'autres modèles murins (Nagao-Kitamoto *et al.*, 2016) que chez les patients souffrant de MII (Li *et al.*, 2014).

Il reste cependant encore difficile de faire des liens directs entre la présence prédominante de certaines espèces bactériennes dans le microbiote et le développement de ces maladies. Plusieurs études ont été faites à ce sujet. Si l'on s'attarde au phylum Firmicutes, nos résultats montrent une diminution d'abondance relative chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant 18 jours au tamoxifène. Associés à ce phylum, une diminution de l'abondance relative des ordres des *Clostridiales* et des *Lactobacillales* est aussi observée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> (résultats non montrés). Appartenant à l'ordre des *Clostridiales*, l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii* est maintenant connue pour jouer un rôle bénéfique dans la protection contre l'inflammation intestinale, puisqu'elle sécrète une protéine anti-inflammatoire (Microbial anti-inflammatory molecule, MAM) (Quévrain *et al.*, 2016). De plus, une déplétion de cette espèce est observable chez les patients souffrant de la maladie de Crohn (Packey et Sartor, 2009). Dans le futur, il serait pertinent de s'intéresser à cette espèce bactérienne dans notre modèle murin. Il serait par exemple possible d'infecter nos souris avec cette espèce bactérienne ou encore de traiter nos souris avec la protéine MAM afin de voir une potentielle atténuation du phénotype inflammatoire.

Une augmentation de l'abondance relative des espèces appartenant au phylum Bacteroidetes est aussi observée dans notre modèle après 18 jours. Si l'on continue plus loin, le genre des *Bacteroides* montre aussi une abondance relative plus élevée chez les souris expérimentales

comparativement aux souris contrôles (Annexe 2,  $*p \leq 0.05$ ). Bien que les espèces appartenant au genre *Bacteroides* soient des espèces de la flore intestinale commensale, Bloom et collaborateurs ont montré en 2011 qu'elles étaient en mesure d'induire une inflammation intestinale chez des sujets susceptibles. En effet, deux groupes de souris, soit un groupe susceptible et un groupe non susceptible à développer une inflammation intestinale, ont été traités avec la même suspension de bactéries commensales appartenant au phylum Bacteroidetes. Au contraire des hôtes non susceptibles, les hôtes susceptibles ont développé une inflammation intestinale suite à ce traitement (Bloom *et al.*, 2011). Ces résultats signifient donc que, chez des hôtes susceptibles, les bactéries de la flore commensale peuvent contribuer à l'inflammation. De plus, *Bacteroides fragilis* et *Bacteroides thetaiotaomicron* sont connues pour exprimer des sulphatases capables de dégrader le mucus (Tsai *et al.*, 1992) et *Bacteroides Vulgatus* a récemment été étudié pour sa capacité à dégrader la mucine 2 (Png *et al.*, 2010). En contexte d'homéostasie intestinale, ces bactéries ont d'ailleurs un effet bénéfique sur le renouvellement de la couche de mucus (Derrien *et al.*, 2010). Par contre, en contexte d'inflammation intestinale une augmentation de l'abondance relative de ces espèces pourrait avoir un effet pro-inflammatoire, en amenuisant davantage la couche de mucus protectrice sur l'épithélium, la couche de mucus étant connue pour être plus mince en contexte inflammatoire (Tsai *et al.*, 1992 ; Png *et al.*, 2010 ; Derrien *et al.*, 2010).

Afin de comprendre comment une telle dysbiose a pu s'installer chez nos souris expérimentales, nous avons analysé des gènes de peptides antimicrobiens connus pour avoir un impact sur la diversité de la flore intestinale, soit *Reg3β* et *Reg3γ* (Annexe 3). En effet, une diminution d'expression de REG3β et de REG3γ est associée à une plus grande abondance des espèces du phylum Firmicutes (Aden *et al.*, 2016). De façon surprenante, l'expression relative de *Reg3β* et de *Reg3γ* est fortement augmentée au 12<sup>e</sup> jour de traitement au tamoxifène. À 18 jours après la première injection de tamoxifène, une tendance à l'augmentation est toujours observable. Corrélée avec cette augmentation d'expression, une diminution de l'abondance relative du phylum Firmicutes est observable à 18 jours. La dysbiose pourrait donc être engendrée par une modulation dans l'expression de ces peptides antimicrobiens. Cette modulation d'expression peut quant à elle être expliquée par la suractivation de STAT3, puisqu'il est connu qu'une phosphorylation de STAT3 sur sa tyrosine 705 entraîne une réponse anti-inflammatoire, notamment via une augmentation de l'expression de REG3β et de REG3γ (Murano *et al.*, 2014 ; Aden *et al.*, 2016).

Pris ensemble, nos résultats montrent que la délétion d'expression de SHP-2 dans l'épithélium intestinal adulte induit des effets semblables à la délétion embryonnaire, tant d'un point de vue histologique et inflammatoire qu'au niveau de la modulation de la signalisation cellulaire et des modulations de la flore intestinale.

## 2. Une différenciation aberrante des cellules caliciformes chez les souris déficientes pour l'expression de SHP-2 précède l'apparition de l'inflammation

Associée à l'inflammation se développant chez le modèle de délétion embryonnaire de SHP-2 (SHP-2<sup>CEI-KO</sup>), une diminution marquée du nombre de cellules caliciformes dans le côlon est observée (Coulombe *et al.*, 2013). Cette diminution du nombre de cellules caliciformes pourrait être attribuable à la diminution d'activation de la voie ERK/MAPK (Coulombe *et al.*, 2013 ; Heuberger *et al.*, 2014). En effet, dans la présente étude, nous avons observé une diminution de la phosphorylation de MEK, du nombre de cellules caliciformes (positives à l'Alcian bleu) et de l'expression de la mucine 2 dans le côlon proximal et distal suite à la délétion conditionnelle de SHP-2. Ces résultats suggèrent que la baisse de production des cellules caliciformes pourrait être à l'origine de l'inflammation observée suite à la délétion de SHP-2 chez l'adulte. Nous ne pouvons cependant exclure la possibilité que la baisse des cellules positives à l'Alcian bleu soit aussi le résultat d'une augmentation de la sécrétion des mucines par ces cellules. En effet, l'inflammation intestinale peut aussi être associée à une sursécrétion des mucines, rendant la visualisation des cellules caliciformes plus difficile (Johansson et Hansson, 2016). Afin d'explorer cette avenue, des observations en microscopie électronique pourraient s'avérer nécessaires à différents jours après l'injection de tamoxifène. La microscopie électronique permettrait de voir si le nombre de cellules caliciformes est vraiment diminué ou si les cellules sont simplement vides de leur contenu en mucines. Des observations en microscopie électronique ont d'ailleurs été faites pour le modèle de délétion embryonnaire et les résultats montrent qu'il y a moins de cellules caliciformes qui sont produites et que celles qui sont produites ne présentent aucun défaut de leur ultrastructure et contiennent plusieurs granules de sécrétion (Coulombe *et al.*, 2013).

Afin de confirmer que la différenciation des cellules caliciformes était aberrante à 18 jours post-tamoxifène, des marqueurs de cellules de Paneth ont été analysés dans le côlon proximal des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>. Normalement absent du côlon proximal, comme dans le cas des souris contrôles, le lysozyme colocalise avec le marquage à l'Alcian bleu, dans le côlon proximal des souris expérimentales (Figure 6A). Ceci suggère donc la présence de cellules de Paneth métaplasiques

ou de cellules intermédiaires dans le côlon proximal des souris ayant subi l'inhibition d'expression de SHP-2 à l'âge adulte. L'expression du gène *Lyz1* est aussi significativement plus élevée chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> tout comme elle l'était dans le modèle de délétion embryonnaire (Coulombe *et al.*, 2016). Pris ensemble, ces résultats confirment donc que la différenciation des cellules caliciformes à partir du précurseur commun Goblet/Paneth est anormale chez les souris déficientes pour SHP-2. Tel que mentionné plus haut, l'inhibition de la signalisation MEK/ERK pourrait être responsable de cette altération. En effet, l'équipe d'Heuberger et collaborateurs a bien montré que l'expression d'une forme constitutive active de MEK1 dans l'épithélium intestinal des souris déficientes pour SHP-2 rétablissait le ratio de cellules caliciformes/de Paneth à un niveau comparable à celui observé chez les souris contrôles (Heuberger *et al.*, 2014). Cependant, dans cette étude, les auteurs ont réalisé les analyses seulement dans l'intestin grêle, là où les cellules de Paneth sont normalement présentes. Nos analyses montrent donc pour la première fois une dérégulation semblable de la différenciation cellulaire au niveau du côlon.

Dans une tout autre série d'expériences, nous avons récemment confirmé la contribution importante de l'inhibition de la voie ERK/MAPK dans l'altération de la différenciation des cellules caliciformes du côlon et dans l'initiation de l'inflammation observée suite à la délétion conditionnelle de SHP-2 dans l'intestin. Nous avons en effet généré un modèle murin exprimant la forme constitutive active de BRAF, (BRAF<sup>V600E</sup>), spécifiquement dans l'épithélium intestinal. Après croisement de ces souris avec les souris SHP-2<sup>CEI-KO</sup>, nous avons observé que l'expression de BRAF<sup>V600E</sup> restaurait le niveau d'activation de ERK1/2 chez ces souris et prévenait complètement l'inflammation intestinale (Gagné-Sansfaçon, Langlois *et al.*, en préparation). Ce modèle murin double-mutant a aussi permis de confirmer l'implication de la voie SHP-2-ERK/MAPK dans la différenciation des précurseurs des cellules caliciformes/de Paneth vers les cellules caliciformes non seulement dans l'intestin grêle, mais aussi dans le côlon (Gagné-Sansfaçon, Langlois *et al.*, en préparation). Nos résultats sont les premiers à montrer une régulation semblable par la voie ERK dans le côlon.

Comme la barrière protectrice de mucus est très importante pour le maintien de l'homéostasie intestinale (Van der Sluis *et al.*, 2006) et que les souris chez qui on observe une diminution du nombre de cellules caliciformes développent une inflammation intestinale sévère, nous nous sommes intéressés à établir la chronologie exacte de ces deux événements. Des cohortes de souris ont été euthanasiées à différents temps pendant le traitement au tamoxifène (Figure 1 et 2). D'abord, à six jours, il est trop tôt pour observer une inhibition de l'expression de SHP-2 à

l'épithélium. À 18 jours, les souris présentent déjà une inflammation sévère, comme discuté plus haut. C'est à dix jours que le modèle semble le meilleur puisque, en absence de signes macroscopiques et microscopiques d'inflammation intestinale (Figure 9), on observe déjà une diminution significative du nombre de cellules caliciformes, et ce, tout au long de l'épithélium colique (Figure 10). Il semble donc que l'altération de la barrière de mucus pourrait se produire avant l'apparition des premiers signes cliniques d'inflammation.

Cette diminution rapide du nombre de cellules caliciformes ne s'accompagne toutefois pas d'une apparition aussi rapide des cellules intermédiaires (Figure 11). En effet, lors du double marquage fait sur les coupes de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, après dix jours de traitement, aucune cellule double marquée n'est visible chez les souris expérimentales. Les marqueurs de cellules de Paneth *Lyz1* et *Defa* ne sont pas non plus significativement plus exprimés, malgré une légère augmentation de l'expression de *Lyz1* pouvant potentiellement témoigner d'un changement en cours.

De manière surprenante, en ce qui concerne les voies de signalisation régulées par SHP-2 à dix jours, celles-ci ne sont pas aussi fortement modulées qu'à 18 jours. En effet, la voie JAK/STAT semble que faiblement activée chez les souris expérimentales alors que la voie ERK/MAPK, normalement fortement inhibée suite à l'inhibition d'expression de SHP-2 (Coulombe *et al.*, 2013), n'est pas significativement modulée, en comparaison avec les souris contrôles. Ce résultat est surprenant considérant le rôle important joué par SHP-2 dans le contrôle du niveau d'activation de ces deux voies de signalisation, et ce, dans divers contextes. Il est possible qu'à 10 jours les changements dans ces voies soient bien présents dans certaines cellules (par exemple, les cellules précurseurs), mais encore non détectables lorsqu'analysés dans un enrichissement de muqueuse. Des analyses en immunohistochimie devront être faites pour localiser les formes phosphorylées et actives de STAT3 et ERK dans la crypte colonique à différents jours post-tamoxifène.

Afin de préciser le moment où l'inflammation colique s'installe, une troisième cohorte de souris a été euthanasiée 12 jours après la première injection de tamoxifène. Au moment de l'euthanasie, les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ne montraient pas de signes cliniques d'inflammation malgré une perte de poids significativement plus élevée. Cependant, les souris expérimentales montraient des altérations à l'épithélium, comme en témoigne la quantification du score histologique (Figure 14D). Ces altérations étant présentes depuis peu, puisqu'absentes à dix jours de traitement, elles n'ont pas pu engendrer de signes cliniques d'inflammation intestinale visibles à l'euthanasie. Par contre, il est

intéressant de voir que des altérations à l'épithélium se développent rapidement après la diminution du nombre de cellules caliciformes observables dans le côlon des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées déjà après dix jours de tamoxifène. Après 12 jours de tamoxifène, cette diminution du nombre de cellules caliciformes est toujours bien visible chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, mais le trop petit nombre d'individus ainsi que la trop grande variabilité entre les individus n'ont pas permis de confirmer la baisse d'expression de la mucine 2, soit celle principalement exprimée et sécrétée par les cellules caliciformes. L'expression des différents facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules épithéliales intestinales devra être aussi analysée après 12 jours de tamoxifène.

De façon concomitante à la diminution du nombre de cellules caliciformes, à dix jours après la première injection de tamoxifène, les souris expérimentales présentent déjà une dysbiose. Des modulations significatives à la hausse du phylum Firmicutes et à la baisse du phylum Bacteroidetes ont été en effet détectées chez les souris expérimentales en comparaison avec les souris contrôles. Ce n'est toutefois pas le type de modulation qui était attendu. En effet, les souris invalidées pour SHP-2 souffrant d'inflammation colique montrent plutôt une augmentation des Bacteroidetes et une diminution des Firmicutes (Coulombe G *et al.*, 2016, et Annexe 1). Une possible augmentation du phylum des Verrucomicrobia est aussi présente. Rappelons que dix jours après le début des injections, les souris expérimentales ne montrent aucun signe d'inflammation, autant clinique qu'histologique. Toutefois, lorsque l'on s'attarde à l'abondance relative des genres bactériens présents chez les souris expérimentales après 10 jours de traitement, les résultats sont surprenants. En effet, malgré l'abondance relative plus élevée du phylum Firmicutes, on constate une diminution de l'abondance relative du genre *Lactobacillus* et du genre *Roseburia*, deux membres du phylum Firmicutes (Annexe 2, \*p≤ 0.05). Les espèces appartenant à ces genres sont bien connues pour avoir des effets bénéfiques sur la muqueuse intestinale (Reiff et Kelly, 2010 ; Machiels *et al.*, 2014). Plusieurs espèces du genre *Lactobacillus* sont des bactéries dites probiotiques, c'est-à-dire qu'il s'agit de bactéries pouvant avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine, si administrées en quantité adéquate (Jandhyala *et al.*, 2015). Quant au genre des *Roseburia*, il s'agit de bactéries produisant, entre autres, du butyrate. Le butyrate est nécessaire à la bonne fonction de l'épithélium, puisque celui-ci est utilisé comme un élément nutritionnel par les cellules (Jandhyala *et al.*, 2015 ; Machiels *et al.*, 2014). La diminution de l'abondance relative de ces deux genres bactériens pourrait vulnérabiliser l'épithélium, rendant ainsi plus probable le développement d'inflammation colique. Un autre genre ayant une abondance relative plus diminuée est le genre *Bifidobacterium* appartenant au phylum Actinobacteria (Annexe 2, \*p≤ 0.05). Encore une fois, certaines bactéries

appartenant à ce genre sont considérées comme étant des bactéries probiotiques (Jandhyala *et al.*, 2015). Donc, malgré l'abondance relative du phylum des Firmicutes qui est à la hausse chez les souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>, plusieurs genres bénéfiques pour la santé digestive semblent plutôt diminués chez ces mêmes souris. Compte tenu du grand nombre de genres au sein du phylum Firmicutes et du grand nombre de genres « non classés » identifiés lors de l'analyse, il n'est pas anormal de constater une augmentation de l'abondance relative du phylum tout en ayant une diminution de l'abondance relative de certains des genres y étant associés.

Il semble donc que, très rapidement après la diminution d'expression de SHP-2, les cellules caliciformes soient déjà affectées. En effet, si on compare les immunobuvardages de SHP-2 à dix et à 18 jours (Figure 2), on peut voir que l'expression de SHP-2 demeure relativement élevée à dix jours, en comparaison avec son expression à 18 jours. Malgré cette inhibition d'expression incomplète et malgré l'absence d'effet sur les voies de signalisation régulées par SHP-2, on observe une diminution du marquage à l'Alcian bleu dès dix jours, cette diminution s'accompagnant d'une dysbiose déjà bien présente (Annexe 2). Comme discuté précédemment, nous ne savons pas, à l'heure actuelle, si cette diminution de marquage peut vraiment être associée à une diminution du nombre de cellules caliciformes ou bien si elle reflète plutôt une augmentation de la capacité de sécrétion des cellules. Comme mentionné précédemment, des analyses complémentaires seront nécessaires afin de mieux cibler le mécanisme affectant la différenciation/la production/la sécrétion des cellules caliciformes.

Afin de plus directement vérifier la contribution de la voie MEK/ERK dans la différenciation des cellules caliciformes, des expériences *in cellulo* ont été réalisées en utilisant la lignée cellulaire LS174T. Les cellules LS174T ont été utilisées comme modèle d'étude puisqu'elles possèdent la capacité de se différencier en cellules caliciformes notamment suite à une inhibition de la voie Notch. Il s'agit d'un modèle d'étude plus simple pour étudier le lien entre la signalisation SHP-2-ERK/MAPK et la différenciation des cellules caliciformes de l'épithélium intestinal. De manière intéressante, l'inhibition de MEK dans ces cellules réduit significativement l'expression de *MUC2* et atténue aussi celle de *TFF3*; par contre, l'expression de *KLF4* reste inchangée. Ce résultat suggère donc que l'expression des marqueurs de différenciation des cellules caliciformes est directement contrôlée par la voie ERK/MAPK.

### 3. L'hyperactivation de la voie Notch semble impliquée dans les altérations de la différenciation des cellules caliciformes observées lors de la délétion d'expression de SHP-2

Nos résultats ainsi que d'autres (Heuberger *et al.*, 2014) suggèrent que la voie ERK/MAPK promeut la différenciation des cellules caliciformes, et ce, aux dépens de la différenciation des cellules de Paneth. Cela dit, une autre voie de signalisation est également bien connue pour contrôler la détermination et la différenciation de plusieurs types cellulaires de l'épithélium intestinal : la voie Notch. Nous avons donc analysé l'expression de certains gènes associés à cette voie et impliqués dans la différenciation cellulaire, soit *Math1*, *Klf4* et *Hes1*, et ce, chez les souris ayant reçu des injections de tamoxifène pendant 18 jours (Figure 7). MATH1 est le facteur de transcription à la base de la signalisation permettant la différenciation en cellules de la lignée sécrétrice soit les cellules entéroendocrines, caliciformes et de Paneth (Fre *et al.*, 2005). Chez les souris expérimentales, l'expression de *Math1* est significativement diminuée, en comparaison aux souris contrôles, ce qui concorde avec la diminution du nombre de cellules caliciformes observables et avec la diminution d'expression de *Muc2* (Fre *et al.*, 2005). Nous avons donc vérifié l'expression de *Klf4*, un facteur de transcription nécessaire à la différenciation terminale des cellules caliciformes (Katz *et al.*, 2002). De manière intéressante, l'expression de *Klf4* est aussi diminuée dans le côlon des souris expérimentales versus celui des souris contrôles. Ce résultat est ainsi en accord avec la diminution du nombre de cellules caliciformes observées suite à la délétion d'expression de SHP-2. Cette baisse d'expression pourrait aussi expliquer l'accumulation de cellules intermédiaires, le précurseur ne recevant pas le signal pour se différencier complètement en cellule caliciforme. Des immunobuvardages d'extraits d'enrichissements de muqueuse de côlon proximal de souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ont aussi été faits, afin de plus directement vérifier la contribution de la voie Notch dans le phénotype des cellules caliciformes de nos souris (Figure 8). De manière intéressante, la voie Notch apparaît effectivement suractivée chez les souris expérimentales, puisque nous observons une augmentation notable du niveau d'expression de NIC, le fragment clivé de Notch. De façon surprenante, cependant, aucune modulation significative de l'expression de *Hes1* n'a été observée. Compte tenu des résultats précédents, nous nous serions attendus à voir une augmentation d'expression de *Hes1* chez les souris expérimentales, ce qui aurait permis d'expliquer la diminution d'expression de *Math1* et, conséquemment, de *Klf4* (Fre *et al.*, 2005) chez nos souris déficientes pour l'expression de SHP-2. Outre *HES1*, l'activation de Notch induit aussi l'expression de *HES5*, *HEY* et *HEYL* (Bray, 2016). Afin de confirmer que l'activation de la voie Notch est plus forte jusqu'au noyau, il serait donc pertinent d'analyser aussi l'expression de ces facteurs de transcription chez la souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> tant en PCR



quantitative qu'en immunohistochimie pour voir leur expression spécifique dans les différents types cellulaires.

Il est ainsi possible d'associer l'augmentation de l'activation de la voie Notch avec la diminution du nombre de cellules caliciformes chez les souris expérimentales surtout celles ayant été traitées pendant 18 jours au tamoxifène. Toutefois, la diminution du nombre de cellules caliciformes qui est observée à dix jours suite à la première injection de tamoxifène ne s'accompagne pas d'une augmentation de l'activation de la voie Notch (Figure 12). Il faut en effet attendre le 12<sup>e</sup> jour de traitement avant de pouvoir associer une augmentation de la présence du fragment clivé de Notch et une diminution du nombre de cellules caliciformes chez les souris expérimentales (Figure 15).

Plusieurs études ont suggéré ont rôle inhibiteur de la voie Notch dans la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice. En effet, l'expression transgénique de NIC diminue la production de tous les types cellulaires de la lignée sécrétrice (Fre *et al.*, 2005). Nous pourrions nous attendre au phénotype complètement inverse lors d'une inhibition de la voie Notch. Cependant, des études chez la souris ont montré que l'inhibition de la voie soit par injection intrapéritonéale de DBZ (l'inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase) ou par inhibition génétique de l'expression de CSL, un membre du complexe transcriptionnel de Notch, augmente de manière importante le nombre de cellules caliciformes dans l'intestin grêle. Toutefois, le nombre de cellules de Paneth chez ces souris, en comparaison avec les souris contrôles, reste inchangé. (van Es *et al.*, 2005). Les effets de l'inhibition de l'activité de Notch ne sont donc pas exactement l'inverse des effets de sa suractivation, ce qui est observé dans notre modèle, puisque le nombre de cellules entéroendocrines reste inchangé (résultat non montré).

Des études ont aussi montré un lien entre la voie Notch et la réponse aux cytokines. En effet, chez des patients atteints de colite ulcéreuse, l'expression de HES1 ainsi que la phosphorylation de STAT3 sont augmentées à l'épithélium (Murano *et al.*, 2014). Cette étude montre que la surexpression de HES1 peut amener une surexpression de peptides antimicrobiens et peut permettre l'activation soutenue de STAT3, via sa phosphorylation. En plus de son rôle dans la prolifération et dans la différenciation, HES1 aurait aussi un rôle à jouer dans la réponse anti-inflammatoire, via son effet sur STAT3 (Murano *et al.*, 2014). Une autre étude a cette fois-ci montré un lien entre la présence de bactéries et l'expression des différents gènes impliqués dans la différenciation des cellules caliciformes. En effet, en incubant des cellules LS174T avec diverses bactéries, il est possible de

moduler l'expression de *HES1*, de *KLF4* et de *MATH1* (Becker *et al.*, 2013). Considérant la dysbiose présente chez les souris ayant subi l'inhibition d'expression de SHP-2, il pourrait s'agir d'une avenue intéressante à explorer.

Des analyses complémentaires devront être faites afin de mettre en lumière la façon dont la voie Notch est impliquée dans le phénotype des souris SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>. Par exemple, pour s'assurer de son implication dans la diminution du nombre de cellules caliciformes observables, des injections intrapéritonéales de l'inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase (le DBZ), pourraient être faites chez des souris ayant subi l'inhibition d'expression de SHP-2. De cette façon, si la voie Notch est impliquée, nous devrions observer un rétablissement du nombre de cellules caliciformes, chez les individus expérimentaux. L'expression des différents ligands, récepteurs et membres du complexe transcriptionnel pourrait aussi être analysée.

Afin d'étudier le lien potentiel entre la voie ERK/MAPK et la voie Notch dans la différenciation des cellules caliciformes, nous avons traité des cellules LS174T ont été traitées avec des inhibiteurs de la voie Notch (DBZ) et de la voie ERK/MAPK (CI-1040), pendant 96h. Tel qu'attendu, l'inhibition de la voie Notch augmente l'expression des gènes associés à la différenciation des cellules caliciformes. De manière intéressante, l'inhibition de MEK par le CI-1040 réduit l'expression des marqueurs de différenciation des cellules caliciformes, mais augmente les niveaux de NIC et de HES1 dans les LS174T. Une cinétique courte avec l'inhibiteur de MEK a aussi permis de voir que l'activation de Notch suite à l'inhibition de MEK se fait aussi rapidement qu'en une heure de traitement (Figure 18). Le modèle cellulaire a donc permis de mettre en lumière un effet de la voie ERK/MAPK sur l'activation de la voie Notch. L'interconnexion des voies ERK et Notch a déjà été rapportée dans d'autres études. Par contre, la plupart de ces études montrent que l'activation de la voie ERK/MAPK entraîne une activation de la voie Notch (Tremblay *et al.*, 2013 ; Yamashita *et al.*, 2013 ; Mittal *et al.*, 2009), ce qui est contraire à nos observations. Toutefois, il est important de mentionner que ces études ont été faites dans d'autres contextes notamment le pancréas, le cancer du sein et la glande thyroïde. Il est donc possible que, dans l'épithélium intestinal, cette coopération se fasse différemment. Nos résultats qui montrent en fait que l'inhibition de MEK augmente le niveau intracellulaire de NIC suggèrent que c'est au niveau du clivage de Notch que pourrait se situer le point de convergence entre les deux voies. Des analyses d'expression des récepteurs Notch ainsi que de la  $\gamma$ -sécrétase sont en cours dans le laboratoire pour vérifier si la signalisation MEK/ERK agit à ce niveau. Il serait également pertinent de vérifier la demi-vie de NIC, un fragment protéique dégradé dans le

protéasome. En effet, NIC possède une séquence PEST dans sa partie N-terminale, ce qui contrôle sa dégradation (Bray, 2016). La phosphorylation de NIC au niveau de cette séquence induit la dégradation de NIC (Christy *et al.*, 2004) Des expériences sont en cours dans le laboratoire pour vérifier l'hypothèse que la signalisation MEK/ERK stimule la dégradation de NIC en le phosphorylant sur cette séquence PEST, une séquence riche en motifs SerPro, le principal motif de phosphorylation par ERK1/2.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce projet aura permis de confirmer l'implication de la tyrosine phosphatase SHP-2 dans le maintien de l'homéostasie de l'épithélium colique chez l'adulte. En modulant des voies de signalisation importantes telles que JAK/STAT3, mais surtout MEK/ERK, SHP-2 contrôle la fonction barrière de l'épithélium colique. En effet, nous avons bien montré que les souris déficientes pour l'expression épithéliale de SHP-2 contiennent moins de cellules caliciformes et développent rapidement une colite sévère. Notre modèle de souris inductibles pour la perte d'expression de SHP-2 a permis de confirmer que l'inflammation est bel et bien précédée par une diminution du nombre de cellules caliciformes et de l'accumulation de cellules intermédiaires dans le côlon. Un défaut dans la différenciation du précurseur commun des cellules caliciformes et des cellules de Paneth pourrait être à l'origine de ce phénotype. En effet, une étude récente réalisée dans l'intestin grêle a effectivement démontré un rôle important pour voie ERK/MAPK dans la différenciation des caliciformes versus de Paneth (Heuberger *et al.*, 2014). Nos résultats révèlent donc qu'une régulation semblable existe aussi dans le côlon, là où résident des milliards de bactéries.

L'accumulation de cellules intermédiaires suggère une présence anormalement élevée de peptides antimicrobiens dans le côlon, ce qui peut modifier la composition et la diversité de la flore. Une dysbiose est effectivement installée chez les souris déficientes pour l'expression épithéliale de SHP-2 (nos résultats, Coulombe *et al.*, 2016). Une modification dans la composition de la microflore est une des caractéristiques observées chez des patients souffrant de maladies inflammatoires intestinales. Il serait vraiment intéressant transférer le microbiote de nos souris expérimentales vers des souris contrôles afin de vérifier le potentiel pro-inflammatoire de ce microbiote. En effet, la question suivante demeure toujours pertinente : est-ce que la dysbiose est une cause ou une conséquence de l'inflammation colique ?

Même si le lien entre la voie SHP-2-ERK/MAPK et la différenciation des cellules caliciformes avait été montré dans l'intestin grêle par l'équipe de Heuberger, les mécanismes d'action impliqués eux demeuraient inconnus. Nos résultats montrent que la voie ERK/MAPK contrôle négativement le niveau d'activation de Notch, une voie bien connue pour son effet inhibiteur sur la différenciation des cellules caliciformes. Plus spécifiquement, la voie ERK/MAPK semble exercer un contrôle négatif sur le niveau d'expression de NIC, le fragment intracellulaire transcriptionnellement actif de Notch. Des travaux sont en cours pour vérifier les mécanismes moléculaires impliqués (modulation de l'expression de Notch1/, de la  $\gamma$ -sécrétase, de la dégradation de NIC ?)

En conclusion, les résultats obtenus au cours de ce projet identifient SHP-2 comme une cible potentielle pour le diagnostic et la thérapeutique des MII. En effet, rappelons que la présence de certains polymorphismes sur le gène *PTPN11*, codant pour la tyrosine phosphatase SHP-2, ont été associés à une susceptibilité accrue à développer une colite ulcéreuse dans une cohorte de patients Japonais (Narumi *et al.*, 2009). Comme les polymorphismes identifiés sont introniques, il est difficile de prédire leur impact sur l'activité ou l'expression de SHP-2. Une collaboration entre notre laboratoire et des gastroentérologues (Dr C. Babakissa et Dre J. Ruel) est en cours pour vérifier si la présence de ces polymorphismes est associée ou non à une diminution d'expression de SHP-2, à une diminution des cellules caliciformes et à la sévérité de l'inflammation chez des patients du Centre intégré universitaire de santé et de services sociaux de l'Estrie- Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CIUSSS de l'Estrie-CHUS) souffrant de MII.

## REMERCIEMENTS

Avant tout, je tiens à remercier ma directrice de recherche Nathalie Rivard. Sans directeur de recherche, aucune recherche ne peut être faite et aucun mémoire ne peut être écrit. Merci Nathalie de m'avoir accueillie en tant que simple stagiaire, d'avoir accepté mes quelques maladresses et de m'avoir permis de poursuivre mon chemin le long de la longue route universitaire. Merci aussi pour tous les congrès. Moi qui, il n'y pas si longtemps, perdait presque connaissance en faisant des oraux, j'ai eu l'opportunité immense de présenter mes résultats dans de beaux congrès, dans de très beaux endroits (BANFF <3!)

Merci aussi à mes évaluateurs, Pre Caroline Saucier et Pr Richard Blouin d'avoir accepté d'intégrer sans hésitation la lecture et la correction de mon mémoire dans votre horaire chargée.

Merci aux membres de mon comité d'encadrement, Pre Nathalie Rivard et Pr François Boudreau.

Après la directrice de recherche et les autres professeurs viennent les collègues que l'on doit côtoyer TOUS les jours de notre vie (pendant plus ou moins deux ans). Disons-le, heureusement qu'ils étaient sympathiques... les journées auraient été particulièrement longues le cas échéant. Donc merci Katia « AGES, REMDUS, TOUTES les assos étudiantes » Beaudry, Sébastien « Babaoooooo le coq » Cagnol, Jessica « J'ai faiiiiim » Gagné-Sansfaçon, Marie-Josée Langlois, Caroline « team mauvaise foi » Leblanc, Vanessa « la reine des lapsus » Vaillancourt-Lavigueur, Stephen McManus (avec un juste un « n », comme dans anus), Jennifer « J'adooooooooore cette boîte! » Raisch et tous les autres, que j'ai côtoyés à un moment ou à un autre de mon parcours dans le labo Rivard. Évidemment, merci aussi à Geneviève Coulombe de m'avoir initié au phénotype SHP-2 et d'avoir laissé assez de questions en suspens pour que je puisse faire une maîtrise.

Pendant mon passage au PRAC, j'ai bien sûr fait beaucoup d'apprentissages au niveau académique, mais j'ai aussi vécu plusieurs expériences enrichissantes sur le plan extra-académique. Notons particulièrement la course de chaises entre les *benchs*, le tour de chariot du magasin dans le corridor, comment mettre le feu de façon efficace dans une hotte de culture cellulaire, comment chasser des souris qui se seraient échappées de leur cage, comment bien resuspendre un inhibiteur sans le renverser, comment lyser des cellules à la seringue sans se piquer... toutes des expériences enrichissantes qui ont contribué à me former en tant que scientifique, mais qu'on ne peut malheureusement pas écrire dans un cv...

Il m'arrivait aussi parfois de quitter ce gros bloc bleu qu'est le PRAC et de côtoyer d'autres gens. Merci à vous les amis (#teammauvaisefois). Merci particulier aux membres de la maisonnée, Francis B. Lavoie (Beau monsieur ou beau bonhomme, pour certains), Charlene (Chat 1) et Claudio (Chat 2). Beau monsieur, les chats, sans vous, ça n'aurait pas été pareil. Vos oreilles poilues m'ont écouté chialer sur toute quand toute chialait au labo, ce qui, en science, arrive plus souvent qu'à son tour. Je vous aime beaucoup beaucoup beaucoup et ma maîtrise, je l'ai finie grâce à votre soutien. Vous êtes mes préférés (classés par ordre de présentation, désolée chat 2).

Finalement, ceux qui m'endurent depuis le début, c'est père (Pierre Langlois) et mère (Claudette Aubin). Vous, vous m'avez endurée du cégep aux études graduées, vous êtes bons. Merci de m'avoir encouragée et d'avoir écouté mes pratiques de séminaires avec des gros points d'interrogation dans les yeux. Aussi, je voudrais remercier mes grands-parents, Henri-Claude Aubin et Thérèse Desloges. Eux aussi ont été là depuis le début et se sont toujours intéressés à ce que je faisais et ont toujours été impressionnés que leur petite-fille continue TOUJOURS l'école. Tellement fiers que la résidence au complet pense que je vais éventuellement guérir le cancer.

Bon, je pense que j'ai fait le tour et que je peux maintenant dire mission accomplie !

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Aden K, Rehman A, Falk-paulsen M, Chamailard M, Kaser A, Aden K, Rehman A, Falk-paulsen M, Secher T, Kuiper J, Tran F, Pfeuffer S (2016) Epithelial IL-23R Signaling Licenses Protective IL-22 Responses in Intestinal Inflammation Article Epithelial IL-23R Signaling Licenses Protective IL-22 Responses in Intestinal Inflammation. 1–11.
- Agazie YM, Hayman MJ (2003) Molecular mechanism for a role of SHP2 in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23:(21):7875–86.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*. 449:(7165):1003–1007.
- Becker S, Oelschlaeger T a., Wullaert A, Pasparakis M, Wehkamp J, Stange EF, Gersemann M (2013) Bacteria Regulate Intestinal Epithelial Cell Differentiation Factors Both In Vitro and In Vivo. *PLoS One*. 8:(2):1–12.
- Bentires-Alj M, Paez JG, David FS, Keilhack H, Halmos B, Naoki K, Maris JM, Richardson A, Bardelli A, Sugarbaker DJ, Richards WG, Du J, Girard L, Minna JD, Loh ML, Fisher DE, Velculescu VE, Vogelstein B, Meyerson M, Sellers WR, Neel BG (2004) Activating Mutations of the Noonan Syndrome-Associated SHP2/PTPN11 Gene in Human Solid Tumors and Adult Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Res*. 64:8816–8820.
- Bjerknes M, Cheng H (2010) Cell Lineage metastability in Gfi1-deficient mouse intestinal epithelium. *Dev. Biol.* 345:(1):49–63.
- Bloom SM, Bijanki VN, Nava GM, Sun L, Malvin NP, Donermeyer DL, Dunne WM, Allen PM, Stappenbeck TS (2011) Commensal Bacteroides species induce colitis in host-genotype-specific fashion in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Cell Host Microbe*. 9:(5):390–403.
- Boucher M-J, Jean D, Vézina A, Rivard N (2004) Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286:G736–G746.
- Bray S (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:678–689.
- Bray SJ (2016) Notch signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:(17):722–735.
- Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, Kishi C, Kc W, Carrero JA, Hunt S, Stone CD, Brunt EM, Xavier RJ, Sleckman BP, Li E, Mizushima N, Stappenbeck TS, Virgin HW (2008) A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 456:(7219):259–63.
- Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology Mol. Biol. Rev.* 75:50–83.
- Chan RJ, Johnson SA, Li Y, Yoder MC, Feng GS (2003) A definitive role of Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating embryonic stem cell differentiation and hematopoiesis. *Blood*. 102:(6):2074–2080.
- Christy F, White B, Jones KA (2004) Mastermind Recruits CycC:CDK8 to Phosphorylate the Notch

- ICD and Coordinate Activation with Turnover. *Mol. Cell.* 16:509–520.
- Clevers HC, Bevins CL (2013) Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annu. Rev. Physiol.* 75:(1):289–311.
- Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 69:(2):238–49.
- Coulombe G, Langlois A, De Palma G, Langlois MJ, McCarville JL, Gagné-Sanfaçon J, Perreault N, Feng GS, Bercik P, Boudreau F, Verdu EF, Rivard N (2016) SHP-2 Phosphatase Prevents Colonic Inflammation by Controlling Secretory Cell Differentiation and Maintaining Host-Microbiota Homeostasis. *J. Cell. Physiol.* 231:(11):2529–2540.
- Coulombe G, Leblanc C, Cagnol S, Maloum F, Lemieux E, Perreault N, Feng G-S, Boudreau F, Rivard N (2013) Epithelial tyrosine phosphatase SHP-2 protects against intestinal inflammation in mice. *Mol. Cell. Biol.* 33:(11):2275–84.
- Coulombe G, Rivard N (2016) New and Unexpected Biological Functions for the Src-Homology. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2:(1):11–21.
- Crosnier C, Stamataki D, Lewis J (2006) Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat. Rev. Genet.* 7:(May):349–359.
- Cuenda A, Rousseau S (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1773:1358–1375.
- Derrien M, van Passel MWJ, van de Bovenkamp JHB, Schipper RG, de Vos WM, Dekker J (2010) Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut Microbes.* 1:(4):254–268.
- Dubeau MF, Iacucci M, Beck PL, Moran GW, Kaplan GG, Ghosh S, Panaccione R (2013) Drug-induced inflammatory bowel disease and IBD-like conditions. *Inflamm. Bowel Dis.* 19:(2):445–456.
- Dupont AW, Dupont HL (2011) The intestinal microbiota and chronic disorders of the gut. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8:(9):523–531.
- van der Flier LG, Clevers H (2009) Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 71:241–260.
- Fre S, Huyghe M, Mourikis P, Robine S, Louvard D A-TS (2005) Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature.* 435:(7044):964–968.
- Fukunaga K, Noguchi T, Takeda H, Matozaki T, Hayashi Y, Itoh H, Kasuga M (2000) Requirement for protein-tyrosine phosphatase SHP-2 in insulin-induced activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J. Biol. Chem.* 275:(7):5208–13.
- Gerbe F, Es J Van, Makrini L, Brulin B, Mellitzer G, Robine S, Romagnolo B, Shroyer N, Bourgaux J, Pignodel C, Clevers H, Jay P (2011) Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* 192:(5):767–780.
- Gregorieff A, Stange D, Kujala P, Begthel H, Born M van den, Korving J, Peters P, Clevers H (2009) The Ets-Domain Transcription Factor Spdef Promotes Maturation of Goblet and Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology.* 137:(4):1333–1345.



- Gribble FM, Reimann F (2016) Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 78:(1):277–299.
- Ha C, Katz S (2013) IBD: Elderly-onset IBD: a milder disease? *J. Gastrointest. Surg. Quirke, P. Rectal Cancer Surg. Optim.* 264:(8):583–591.
- Hatakeyama M (2004) Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat. Rev. Cancer.* 4:(9):688–694.
- He Z, Zhu HH, Bauler TJ, Wang J, Ciaraldi T, Alderson N, Li S, Raquil MA, Ji K, Wang S, Shao J, Henry RR, King PD, Feng GS (2013) Nonreceptor tyrosine phosphatase Shp2 promotes adipogenesis through inhibition of p38 MAP kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:(1):E79–88.
- Hermiston M, Gordon J (1995) Inflammatory Bowel Disease and Adenomas in Mice Expressing a Dominant Negative N-Cadherin. *Science.* 270:(5239):1203–1207.
- Heuberger J, Kosel F, Qi J, Grossmann KS, Rajewsky K, Birchmeier W (2014) Shp2/MAPK signaling controls goblet/paneth cell fate decisions in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:(9):3472–7.
- Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Masahiro Asaka (2002) SHP-2 Tyrosine Phosphatase as an Intracellular Target of *Helicobacter pylori* CagA Protein. *Science.* 295:(5555):683–686.
- Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C, Rivard N (2001) Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J. Biol. Chem.* 276:(24):21885–94.
- Huttenhower C, Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 486:(7402):207–14.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* 21:(29):8836–8847.
- Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillermin V, Guillemot F, Jensen J, Kedinger M, Gradwohl G (2002) Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J.* 21:(23):6338–6347.
- Johansson ME V, Hansson GC (2016) Immunological aspects of intestinal. *Nat. Rev. Immunol.* 16:(10):639–649.
- Joshi S, Platanias LC (2014) Mnk kinase pathway: Cellular functions and biological outcomes. *World J. Biol. Chem.* 5:(3):321–33.
- Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky P a, Yang VW, Kaestner KH (2002) The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development.* 129:(11):2619–2628.
- Kaushal M, Chorawala M (2012) The JAK / STAT Signaling Pathway. *Int. J. Adv. Res. Pharm. Bio Sci.* 2:(3):363–385.
- Kim YS, Ho SB (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12:(5):319–330.

- Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu J-F, Boucher M-J, Rivard N (2002) Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* 277:(10):8226–34.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW (1994) A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.* 372:739–46.
- Lenormand P, Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J (1998) Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J. Cell Biol.* 142:(3):625–633.
- Li J, Butcher J, Mack D, Stintzi A (2014) Functional Impacts of the Intestinal Microbiome in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 0:(0):1–15.
- Li Y, de Haar C, Peppelenbosch MP, van der Woude JC (2012) New insights into the role of STAT3 in IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* 18:(6):1177–1183.
- Li Y, Jiang BH, Ensign WY, Vogt PK, Han J (2000) Myogenic differentiation requires signalling through both phosphatidylinositol 3-kinase and p38 MAP kinase. *Cell. Signal.* 12:(11–12):751–757.
- Lovegrove A, Edwards CH, De Noni I, Patel H, El SN, Grassby T, Zielke C, Ulmuis M, Nilsson L, Butterworth PJ, Ellis P., Shewry PR (2015) Role of Polysaccharides in Food, Digestion and Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57:(2):237–253.
- Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V, Ballet V, Claes K, Immerseel F Van, Verbeke K, Ferrante M, Verhaegen J, Rutgeerts P, Vermeire S (2014) A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 63:1275–1283.
- Madison BB, Dunbar L, Qiao XT, Braunstein K, Braunstein E, Gumucio DL (2002) Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J. Biol. Chem.* 277:(36):33275–83.
- Marjou F El, Janssen K, Chang BH, Li M, Chan L, Louvard D, Chambon P, Metzger D, Robine S (2004) Tissue-Specific and Inducible Cre-Mediated Recombination in the Gut Epithelium. *Genesis.* 193:(3):186–193.
- Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC, Podolsky DK (1996) Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science.* 274:(5285):262–5.
- McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin THJ, Radford-Smith G (2009) Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 15:(1):100–113.
- Meloche S, Pouyssegur J (2007) The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1-to S-phase transition. *Oncogene.* 26:3227–3239.
- Mittal S, Subramanyam D, Dey D, Kumar R V, Rangarajan A (2009) Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breastcarcinogenesis. *Mol. Cancer.* 8:(128):1–12.
- Mori-Akiyama Y, van den Born M, van Es JH, Hamilton SR, Adams HP, Zhang J, Clevers H, de Crombrughe B (2007) SOX9 Is Required for the Differentiation of Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. *Gastroenterology.* 133:(2):539–546.

- Mudter J, Weigmann B, Bartsch B, Kiesslich R, Strand D, Galle PR, Lehr HA, Schmidt J, Neurath MF (2005) Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *Am. J. Gastroenterol.* 100:64–72.
- Murano T, Okamoto R, Ito G, Nakata T, Hibiya S, Shimizu H, Fujii S, Kano Y, Mizutani T, Yui S, Akiyama-Morio J, Nemoto Y, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M (2014) Hes1 promotes the IL-22-mediated antimicrobial response by enhancing STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443:(3):840–846.
- Murray PJ (2007) The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration 1. *J Immunol Ref.* 178:2623–2629.
- Musso A, Dentelli P, Carlino A, Chiusa L, Repici A, Sturm A, Fiocchi C, Rizzetto M, Pegoraro L, Sategna-Guidetti C, Brizzi MF, Abstract: (2005) Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Signaling Pathway. *Inflamm. Bowel Dis.* 11:(2):91–98.
- Nagao-Kitamoto H, Shreiner AB, Gilliland MG, Kitamoto S, Ishii C, Hirayama A, Kuffa P, El-Zaatari M, Grasberger H, Seekatz AM, Higgins PDR, Young VB, Fukuda S, Kao JY, Kamada N (2016) Functional Characterization of Inflammatory Bowel Disease–Associated Gut Dysbiosis in Gnotobiotic Mice. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2:(4):468–481.
- Narumi Y, Isomoto H, Shiota M, Sato K, Kondo S, MacHida H, Yanagihara K, Mizuta Y, Kohno S, Tsukamoto K (2009) Polymorphisms of PTPN11 coding SHP-2 as biomarkers for ulcerative colitis susceptibility in the Japanese population. *J. Clin. Immunol.* 29:303–310.
- Neel BG, Gu H, Pao L (2003) The “Shp”ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* 28:(6):284–293.
- Ouellette AJ (2011) Paneth cell  $\alpha$ -defensins in enteric innate immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:2215–2229.
- Packey CD, Sartor RB (2009) Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 22:(3):292–301.
- Png CW, Linden SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, McGuckin MA, Florin TH (2010) Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol.* 105:(11):2420–2428.
- Qu  vrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Berm  dez-Humar  n LG, Pigneur B, Lequin O, Kharrat P, Thomas G, Rainteau D, Aubry C, Breyner N, Afonso C, Lavielle S, Grill J-P, Chassaing G, Chatel JM, Trugnan G, Xavier R, Langella P, Sokol H, Seksik P (2016) Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn’s disease. *Gut.* 65:(3):415–25.
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* 117:(8).
- Reiff C, Kelly D (2010) Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *Int. J. Med. Microbiol.* 300:(1):25–33.
- Rivard N, Boucher M-J, Asselin C, L’Allemain G (1999) MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 277:(4 Pt

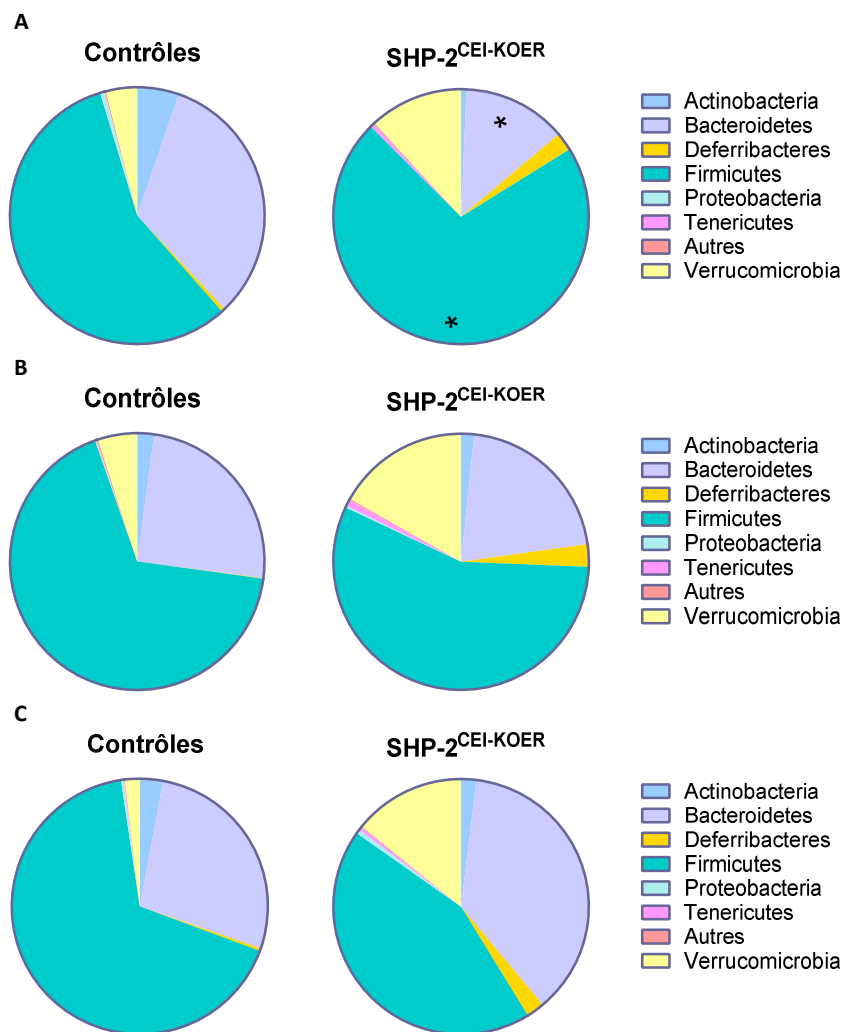
1):C652–C664.

- Roberts AE, Allanson JE, Tartaglia M, Gelb BD (2013) Noonan syndrome. *Lancet*. 381:333–342.
- Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, Roberts AE, Robinson W, Takemoto CM, Noonan JA (2010) Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics*. 126:(4):746–59.
- Ruel J, Ruane D, Mehandru S, Gower-Rousseau C, Colombel J-F (2014) IBD across the age spectrum- is it the same disease? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 11:(2):88–98.
- Sánchez de Medina F, Romero-Calvo I, Mascaraque C, Martínez-Augustin O (2014) Intestinal Inflammation and Mucosal Barrier Function. *Inflamm. Bowel Dis*. 20:(12):2394–2404.
- Sasaki N, Sachs N, Wiebrands K, Ellenbroek SIJ, Fumagalli A (2016) Reg4 + deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5 + stem cells in colon. 4:1–9.
- Sato T, Es J, Snippert H, Stange D, Vries R, Born M van den, Barker N, Shroyer N, Wetering M van de, Clevers H (2011) Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*. 469:(7330):415–418.
- Saxton TM, Henkemeyer M, Gasca S, Shen R, Rossi DJ, Shalaby F, Feng G-S, Pawson T (1997) Abnormal mesoderm patterning in mouse embryos mutant for the SH2 tyrosine phosphatase Shp-2. *EMBO J*. 16:(9):2352–2364.
- Shi ZQ, Lu W, Feng GS (1998) The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem*. 273:(9):4904–4908.
- Shim JO, Seo JK (2014) Very early-onset inflammatory bowel disease (IBD) in infancy is a different disease entity from adult-onset IBD; one form of interleukin-10 receptor mutations. *J. Hum. Genet*. 59:(10):337–341.
- Van der Sluis M, De Koning B a E, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, B??ller H a., Dekker J, Van Seuningen I, Renes IB, Einerhand AWC (2006) Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection. *Gastroenterology*. 131:(1):117–129.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem*. 150:(1):76–85.
- Specian RD, Oliver MG (1991) Functional biology of intestinal goblet cells. *Am. J. Physiol*. 260:183-C193.
- Strugala V, Dettmar PW, Pearson JP (2008) Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int. J. Clin. Pract*. 62:(5):762–769.
- Sugimoto K (2008) Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol*. 14:(33):5110–5114.
- Tajan M, de Rocca Serra A, Valet P, Edouard T, Yart A (2015) SHP2 sails from physiology to pathology. *Eur. J. Med. Genet*. 58:(10):509–525.

- Tartaglia M, Martinelli S, Cazzaniga G, Cordeddu V, Iavarone I, Spinelli M, Palmi C, Carta C, Pession A, Aricò M, Masera G, Basso G, Sorcini M, Gelb BD, Biondi A (2004) Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood*. 104:(2):307–313.
- Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, van der Burgt I, Crosby AH, Ion A, Jeffery S, Kalidas K, Patton MA, Kucherlapati RS, Gelb BD (2001) Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat. Genet.* 29:(4):465–8.
- Tartaglia M, Niemeyer CM, Song X, Buechner J, Jung A, Hählen K, Hasle H, Licht JD, Gelb BD (2003) Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* 34:(2):148–151.
- Tom BH, Rutzky LP, Jakstys MM, Oyasu R, Kaye CI, Kahan BD (1976) Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro*. 12:(3):180–91.
- Tremblay I, Paré E, Arseneault D, Douziech M, Boucher MJ (2013) The MEK/ERK pathway promotes NOTCH signalling in pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 8:(12):1–11.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*. 29:(1):52, 54.
- Tsai HH, Sunderland D, Hart A, Rhodes JM (1992) A Novel Mucin Sulphatase From Human Faeces: its identification, purification and characterization. *Clin. Sci.* 82:447–454.
- Turner AM (2014) Noonan syndrome. *J. Paediatr. Child Health*. 50:(10):E14–E20.
- Vogel W, Lammers R, Huang J, Ullrich A (1992) Activation of a Phosphotyrosine Phosphatase by Tyrosine Phosphorylation Wolfgang. *Science*. 259:(5101):1611–1614.
- Wagner EF, Nebreda AR (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 9:(8):537–549.
- Wang Y, George SP, Roy S, Pham E, Esmaeilniakooshkghazi A, Khurana S (2016) Both the anti- and pro-apoptotic functions of villin regulate cell turnover and intestinal homeostasis. *Sci. Rep.* 6:(September):35491.
- Wasylyk B, Hagman J, Gutierrez-Hartmann A (1998) Ets transcription factors: Nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Biochem. Sci.* 23:(6):213–216.
- Wilson JC, Furlano RI, Jick SS, Meier CR (2016) Inflammatory Bowel Disease and the Risk of Autoimmune Diseases. *J. Crohn's Colitis*. 10:(2):186–193.
- Xavier RJ, Podolsky DK (2007) Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 448:(7152):427–434.
- Xing J, Ginty DD, Greenberg ME (1996) Coupling of the RAS-MAPK Pathway to Gene Activation by RSK2, a Growth Factor-Regulated CREB Kinase. *Science (80-. )*. 273:(5277).
- Xu D, Qu C-K (2008) Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front. Biosci.* 13:4925–32.

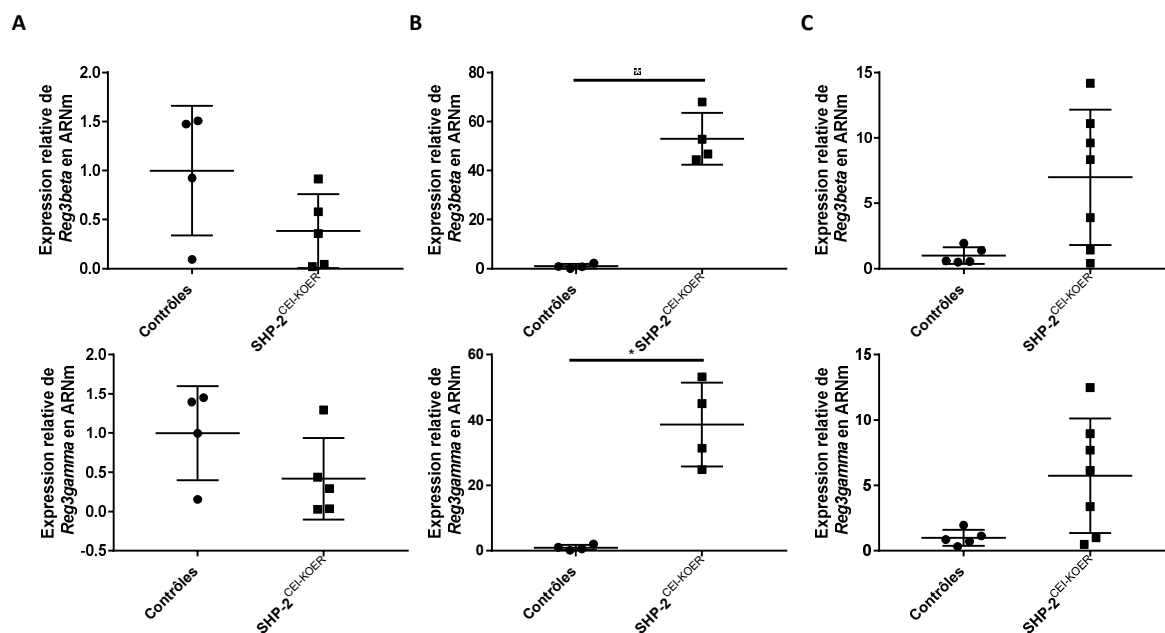
- Yamashita AS, Geraldo MV, Fuziwara CS, Kulcsar MAV, Friguglietti CUM, da Costa RB, Baia GS, Kimura ET (2013) Notch pathway is activated by MAPK signaling and influences papillary thyroid cancer proliferation. *Transl. Oncol.* 6:(2):197–205.
- Yamashita H, Kotani T, Park J-H, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Ku Y, Matozaki T (2014) Role of the protein tyrosine phosphatase Shp2 in homeostasis of the intestinal epithelium. *PLoS One.* 9:(3):e92904.
- You M, Yu DH, Feng GS (1999) Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19:(3):2416–24.
- Zhang EE, Chapeau E, Hagihara K, Feng G (2004) Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:(45):16064–9.

## ANNEXES

**Annexe 1 : Analyse de l'abondance relative des différents phyla bactériens chez les souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup>**


Les cæcums des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ont été prélevés à 10 (**A**), 12 (**B**) et 18 (**C**) jours. L'ADN bactérien a par la suite été extrait à partir des fèces contenues dans les cæcums. Suite à cette extraction, un séquençage Illumina de l'ARN 16s bactérien a été fait, afin d'établir la composition de la flore intestinale des souris contrôles et des souris expérimentales. Des graphiques en camembert ont été produits, afin d'illustrer l'abondance relative des différents phyla bactériens présents dans la flore intestinale des souris contrôles et des souris expérimentales.

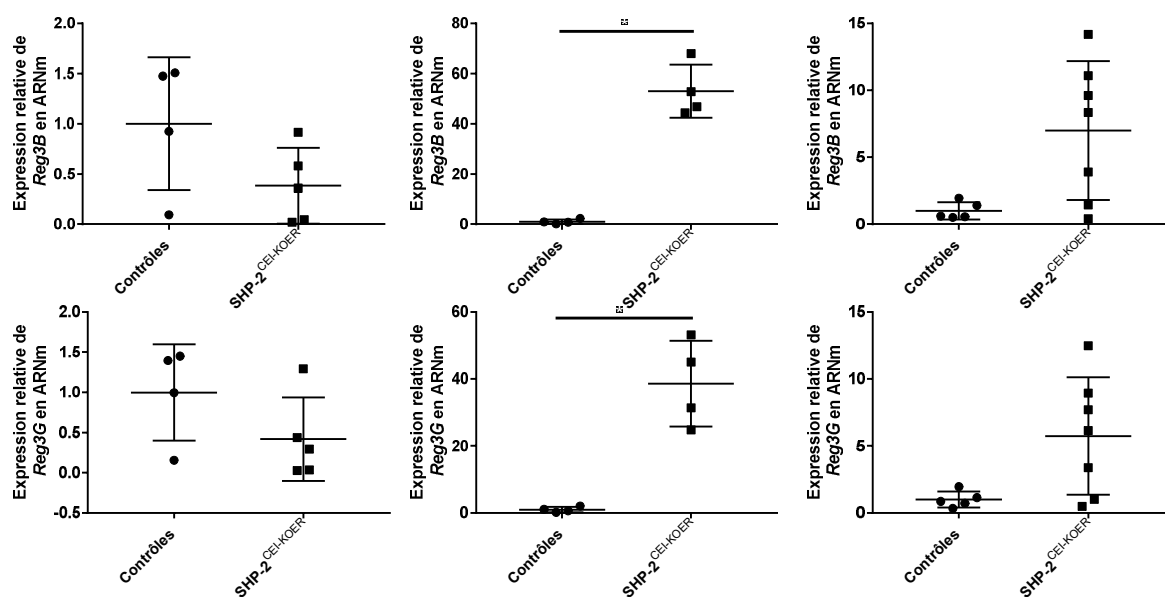
**Annexe 2 : Analyses de genres bactériens associés à une bonne santé digestive chez les souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> à 10 et 18 jours de traitement au tamoxifène**



Les cæcums des souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> ont été prélevés à 10 (B) et à 18 (A) jours de traitement au tamoxifène. L'ADN bactérien a par la suite été extrait à partir des fèces contenues dans les cæcums. Suite à cette extraction, un séquençage Illumina de l'ARN 16s bactérien a été fait, afin d'établir la composition de la flore intestinale des souris contrôles et des souris expérimentales. Des analyses statistiques ont été faites (Test de Mann-Whitney, \*p ≤ 0.05).



**Annexe 3 : Expression relative en ARNm des gènes *Reg3b* et *Reg3g* chez les souris contrôles et SHP-2<sup>CEI-KOER</sup> traitées pendant 10, 12 et 18 jours au tamoxifène.**



L'ARN a été extrait d'échantillons d'enrichissements de muqueuse de souris contrôles et expérimentales traitées pendant 10 (A), 12 (B) et 18 (C) jours au tamoxifène (\*p ≤ 0.05, NS : Non-significatif). L'expression relative de ces gènes a été normalisée sur les gènes de référence *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp*.